

**Ein Infektionsmodell für *Borrelia persica*
in immunkompetenten C3H/HeOuJ-Mäusen**

von Sandra Schwarzer

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

**Ein Infektionsmodell für *Borrelia persica*
in immunkompetenten C3H/HeOuJ-Mäusen**

von Sandra Schwarzer

aus Zwickau

München 2017

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:
Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph. D.

Mitbetreuung durch: Dr. Evelyn Overzier und Dr. Anna Rettinger

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Manfred Gareis

Tag der Promotion: 11. Februar 2017

Für meine Eltern und Großeltern

INHALTSVERZEICHNIS

I	EINLEITUNG	1
II	LITERATURÜBERSICHT	3
1	Rückfallfieberborrelien	3
1.1	Taxonomie und Nomenklatur.....	3
1.2	Vorkommen von Rückfallfieberborrelien	5
1.3	Morphologische Eigenschaften	6
2	<i>Ornithodoros tholozani</i>	7
2.1	Taxonomie und Nomenklatur.....	7
2.2	Verbreitung von <i>Ornithodoros</i> -Zecken.....	8
2.3	Lebensweise	10
2.4	Vektorfunktion und Infektionsrate	11
3	Epidemiologie – Rückfallfieber im Iran und in Israel	12
4	Klinik	15
4.1	Fallbeispiel Mensch.....	16
4.2	Erkrankungen beim Tier.....	17
5	Genetik und Immunevasion	18
6	Diagnostik	19
6.1	Direkter Erregernachweis im Blutaussstrich und Anreicherungs- methode	19
6.2	Quantitative Buffy-Coat-Analyse	21
6.3	In-vitro-Kultivierung	21
6.4	In-vivo-Kultivierung	23
6.5	Molekulare Nachweismethoden	23
6.6	Serologische Nachweismethoden.....	24
7	Therapie	25
7.1	Antibiotische Behandlung	25
7.2	Komplikationen – Jarisch-Herxheimer-Reaktion.....	26
8	Prävention	27
8.1	Bekämpfung von Zecken	27
8.2	Prophylaktischer Einsatz von Antibiotika.....	28

9	Mausmodelle	28
III	PUBLIKATION	31
IV	DISKUSSION	47
1	Weiterführende Methoden- und Ergebnisdiskussion unter Einbeziehung von Tiermodellen aus der Literatur	48
2	Potentielle Reservoirre für <i>B. persica</i>	58
3	Nutzen und Ausblick	61
V	ZUSAMMENFASSUNG	65
VI	SUMMARY	67
VII	LITERATURVERZEICHNIS	69
VIII	ANHANG	85
IX	DANKSAGUNG	87

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

#	Nummer
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ARDS	acute respiratory distress syndrome (akutes Lungenversagen)
<i>B.</i>	<i>Borrelia</i>
Bp	<i>Borrelia persica</i>
BSK	Barbour-Stoenner-Kelly
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
C _t	threshold cycle
destil.	destilliert
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
e.g.	exempli gratia (zum Beispiel)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
engl.	englisch
et al.	et alii (und andere)
Fig	figure (Abbildung)
<i>flaB</i>	Flagellin-B-Gen
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GlpQ	Glycerophosphodiester-Phosphodiesterase
<i>glpQ</i>	Glycerophosphodiester-Phosphodiesterase-Gen
GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde - Society of Laboratory Animal Science
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPA-Filter	High Efficiency Particulate Air filter (Schwebstofffilter)
IFA	Immunofluorescence Assay (Immunfluoreszenztest)

Ig	Immunglobulin
JHR	Jarisch-Herxheimer-Reaktion
kA	keine Angabe
kDa	Kilodalton
KELA	kinetischer ELISA
kg	Kilogramm
l	Liter
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
log	Logarithmus
mg	Milligramm
min	Minute
MKP-Medium	modifiziertes Kelly-Pettenkofer-Medium
ml	Milliliter
mm	Millimeter
Mw	molecular-weight size marker (Komigrationsstandard)
n	Anzahl
nd	not done (nicht durchgeführt)
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NTC	no template control (Negativkontrolle)
<i>O.</i>	<i>Ornithodoros</i>
P	Passage
p.i.	post infectionem (nach einer Infektion)
PBS	phosphate-buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
pH	pH-Wert
PTFE	Polytetrafluorethylen
QBC-Analyse	quantitative Buffy-Coat-Analyse
qPCR	quantitative real-time PCR
RF	relapsing fever (Rückfallfieber)
RFLPs	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomal ribonucleic acid (ribosomale Ribonukleinsäure)
<i>rrs</i>	16S-rRNA-Gen
s	Sekunde

SPF	spezifiziert pathogenfrei
spp.	Spezies (Plural)
TBRF	tick-borne relapsing fever (von Zecken übertragenes Rückfall- fieber)
TBS	Tris-buffered saline (Tris-gepufferte Kochsalzlösung)
TTBS	TBS mit Tween 20
USA	United States of America (Vereinigte Staaten von Amerika)
V	Volt
var.	varietas (Varietät)
Vlp	variable large protein (variables großes Protein)
Vmp	variable major protein (variables Hauptprotein)
Vsp	variable small protein (variables kleines Protein)
x g	x Erdbeschleunigung
z. B.	zum Beispiel

I EINLEITUNG

Bereits 1868 entdeckte Obermeier während einer Epidemie in Berlin fadenförmige, sich bewegende Gebilde im Blut von Rückfallfiebererkrankten, welche er als spezifisch für die Fieberzeit der sogenannten Recurrens beschrieb und als mögliche Ursache diskutierte (OBERMEIER, 1968). Eine eigenständige Art von Spirochäten, die das persische Rückfallfieber hervorruft, wurde von Dschunkowsky 1913 beschrieben. Er bezeichnete diesen Erreger nach dem Ort seiner Entdeckung als *Spirochaeta persica* (DSCHUNKOWSKY, 1913). Die Übertragung erfolgt beim Saugakt der *Ornithodoros tholozani*-Zecke an ihrem Wirt (RAFINEJAD et al., 2011). In Gebieten wie dem Mittleren Osten, Zentralasien und Indien verursacht dieses Bakterium, heute *Borrelia persica* genannt, beim Menschen klinisch erkennbares Rückfallfieber (ASSOUS et al., 2009). Charakteristisch für die Erkrankung sind wiederkehrende Fieberschübe, welche mit unspezifischen Symptomen einhergehen können (ARSHI et al., 2002). Obwohl in der Vergangenheit die Anzahl der jährlichen Neuerkrankungen sowohl in der iranischen als auch in der israelischen Bevölkerung zurückging (MASOUMI ASL et al., 2009; SIDI et al., 2005), blieb der Durchschnitt der jährlichen Inzidenz im israelischen Militär relativ konstant (SIDI et al., 2005). Rückfallfieber gilt außerdem als unterberichtet (RAFINEJAD et al., 2012) und es ist möglich, dass eine große Fallzahl unentdeckt bleibt, wenn Patienten während einer fieberfreien Phase untersucht werden (NADDAF et al., 2011). In Israel und im Iran ist die Erkrankung immer noch als endemisch eingestuft und stellt eine erhebliche Gefahr für die Menschen dar (SIDI et al., 2005; MASOUMI ASL et al., 2009). Des Weiteren kann Rückfallfieber aufgrund von Reiseaktivitäten infizierter Personen auch in nicht endemischen Gebieten auftreten (KUTSUNA et al., 2013; COLIN DE VERDIÈRE et al., 2011). Deshalb wird die von Zecken übertragene Rückfallfieberborreliose als eine „emerging disease“ (engl. für neuauftretende Krankheit) bezeichnet (REBAUDET et al., 2006) und sie sollte als mögliche Diagnose in Betracht gezogen werden, sobald sich fieberig erkrankte Patienten kürzlich in Regionen aufgehalten haben, in denen Rückfallfieber endemisch ist (KUTSUNA et al., 2013; ARSHI et al., 2002). Um die Infektionskrankheit im Detail erforschen und charakterisieren zu können, ist ein geeignetes In-vivo-Infektionsmodell unabdingbar. Für *B. persica* wurden bisher hauptsächlich Meerschweinchen verwendet, um das Bakterium im Labor

zu erhalten und Erregermaterial für Forschungsarbeiten zu produzieren (KARIMI et al., 1979; MARTI RAS et al., 1996; NADDAF et al., 2011; OSHAGHI et al., 2011; RAFINEJAD et al., 2011). Es existieren jedoch wenige Studien, in denen Mäuse zum Einsatz kamen (BABUDIERI, 1957; ASSOUS et al., 2006). Diese Modelle sind unzureichend charakterisiert, um darauf aufbauend neue Erkenntnisse in der Erforschung des *B. persica*-Rückfallfiebers zu erlangen. Um eine Vergleichbarkeit mit anderen Studien verschiedener Spezies von Rückfallfieberborrelien zu ermöglichen, wurde in der vorliegenden Forschungsarbeit die Infektion von *B. persica* in einem immunkompetenten Mausstamm untersucht. Diese Tierart wird als geeignetes Modell angesehen, um unterschiedlichen wissenschaftlichen Fragestellungen in der Rückfallfieberforschung nachzugehen (GARCIA-MONCO et al., 1997; NORDSTRAND et al., 2001; ALUGUPALLI et al., 2003; LARSSON et al., 2009).

Um Erkenntnisse über die Entstehung und den Verlauf der Infektion zu erlangen, wurden 44 immunkompetente C3H/HeOuJ-Mäuse mit variierenden Dosen von 1×10^6 , 1×10^4 , 1×10^2 und 4×10^0 *B. persica* pro Tier intradermal infiziert und so die kleinste infektiöse Dosis ermittelt. Über tägliche klinische Untersuchungen und regelmäßige Blutentnahmen konnten sowohl die Belastung der Tiere durch die Infektion und die Menge an Spirochäten im Blut als auch die Antikörperproduktion über die Zeit post infectionem (p.i.) erfasst und analysiert werden. Am Versuchsende wurden Organe wie Herz, Milz, Niere, Harnblase, Tarsalgelenk, Gehirn und Haut von der Injektionsstelle entnommen, um die Zielorgane einer *B. persica*-Dissemination in Mäusen zu ermitteln. Dafür wurden die Gewebeproben molekular mittels real-time PCR auf spezifische DNA und per In-vitro-Kultivierung im selbstentwickelten Flüssignährmedium auf lebensfähige Erreger untersucht. Des Weiteren wurden Organschnitte histopathologisch auf entzündliche Veränderungen geprüft.

Das in dieser Studie etablierte In-vivo-Infektionsmodell in immunkompetenten Mäusen kann als Grundlage für künftige Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der Rückfallfieberborreliose, hervorgerufen durch *B. persica*, verwendet werden. Mit diesem murinen Tiermodell könnten neue Einblicke in die Pathogenese einer *B. persica*-Infektion gewonnen und die resultierenden Abwehrreaktionen des Tierkörpers immunologisch analysiert werden, um neue diagnostische Methoden und Therapieansätze entwickeln und somit die Infektion effizienter nachweisen, behandeln oder vorbeugen zu können.

II LITERATURÜBERSICHT

1 Rückfallfieberborrelien

1.1 Taxonomie und Nomenklatur

Die Gattung *Borrelia* (B.) ordnet sich in die Familie der Spirochaetaceae ein. Neben drei weiteren Familien der Ordnung Spirochaetales gehört sie in die Klasse der Spirochaetes, welche sich wiederum im Stamm der Spirochaetes eingliedert. Zu den Borrelien werden derzeit 37 Spezies gezählt (Stand 2016). Eine davon ist *B. persica* (EUZÉBY, 1997a, 1997b).

Taxonomie und Einordnung von *B. persica*:

Stamm: Spirochaetes

Klasse: Spirochaetes

Ordnung: Spirochaetales

Familie: Brachyspiraceae

Familie: Brevinemataceae

Familie: Leptospiraceae

Familie: Spirochaetaceae

Gattung: *Borrelia*

Art: *Borrelia persica*

basierend auf Euzéby (EUZÉBY, 1997a, 1997b)

Die Borrelien werden in zwei Gruppen unterteilt. Darunter fallen zum einen Spezies wie beispielsweise *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii* und *B. bavariensis*, welche zum Komplex *B. burgdorferi* sensu lato gehören (WANG et al., 2010; MARGOS et al., 2013). Die Bakterien werden durch Schildzecken der Gattung *Ixodes* übertragen und gelten als Erreger der Lyme-Borreliose (PAROLA et al., 2001; COOK, 2015). Eine Neubenennung der Lyme-Borrelien sowie die Einordnung in eine separate Gattung (*Borrelia*) wurden erst kürzlich vorgeschlagen (ADEOLU et al., 2014), sodass im Folgenden dieser Arbeit nicht weiter darauf eingegangen wird.

Neben dem *B. burgdorferi* sensu lato-Komplex existiert zum anderen die Gruppe der Rückfallfieberborrelien (WANG et al., 2010). Diese werden hauptsächlich durch Lederzecken der Gattung *Ornithodoros* auf ihren Wirt übertragen

(GOUBAU, 1984). Ausnahmen hiervon bilden die Spezies *B. recurrentis*, welche durch Läuse (*Pediculus humanus*) weitergegeben wird (GOUBAU, 1984), und Arten wie *B. theileri*, *B. miyamotoi* und *B. lonestari*, die durch Schildzecken übertragen werden (PIESMAN et al., 2010).

Eine phylogenetische Einteilung verschiedener Spezies kann unter anderem mit einer DNA-Analyse nach PCR-Amplifikation und anschließender Sequenzierung erfolgen (ASSOUS et al., 2009). In einer der ersten Studien, in der *B. persica* mit-erfasst wurde, nutzten Marti Ras et al. die 16S-rRNA-Gensequenz (*rrs*), um 20 Spezies von Rückfallfieberborrelien zu vergleichen. Die Ähnlichkeit der Sequenzen von *B. persica* und den anderen Spezies lag dabei zwischen 96,4 % und 98,7 %. Die größte genetische Ähnlichkeit hatte *B. persica* mit *B. hispanica* und *B. crocidurae*, während sich die geringste Übereinstimmung mit *B. miyamotoi* ergab. Die Autoren beschrieben die phylogenetische Position von *B. persica* als unsicher (MARTI RAS et al., 1996). In einer jüngeren phylogenetischen Studie wurden alle Isolate aus Israel und dem Westjordanland, die aus *O. tholozani*-Zecken und dem Blut von Rückfallfieberpatienten gewonnen wurden, als *B. persica* identifiziert. Sie bildeten im phylogenetischen Baum, der auf Grundlage des 16S-rRNA-Genes erstellt wurde, eine separate Gruppe zu den anderen Rückfallfieberborrelien. Bei der Analyse der 16S rRNA der *B. persica*-Isolate konnte die Existenz von zwei Genovaren festgestellt werden, die sich durch eine Basenmodifikation an Position 625 unterschieden. Die Analyse der verfügbaren Sequenzen der Rückfallfieberborrelien zeigte, dass die Base Adenin charakteristisch für die Borrelien der sogenannten Alten Welt ist (z. B. *B. recurrentis*, *B. hispanica* und *B. duttonii*) und die Base Guanin in den Sequenzen der Spezies der Neuen Welt auffindbar ist (z. B. *B. hermsii*, *B. parkeri* und *B. turicatae*). *B. persica* nimmt als bisher einzige Spezies eine Zwischenstellung ein, da die Sequenz beide Varianten aufweisen kann (SAFDIE et al., 2010). In einem anderen Ansatz wurde das Flagellin-B-Gen (*flaB*) sequenziert. Der Sequenzvergleich (Abbildung 1) ergab auch hier eine deutliche Abgrenzung der Rückfallfieberborrelien aus Israel zu denen aus Afrika bzw. Amerika (ASSOUS et al., 2006).

Im Jahr 2014 wurde erstmals eine komplette Genomsequenz von *B. persica* veröffentlicht (ELBIR et al., 2014).

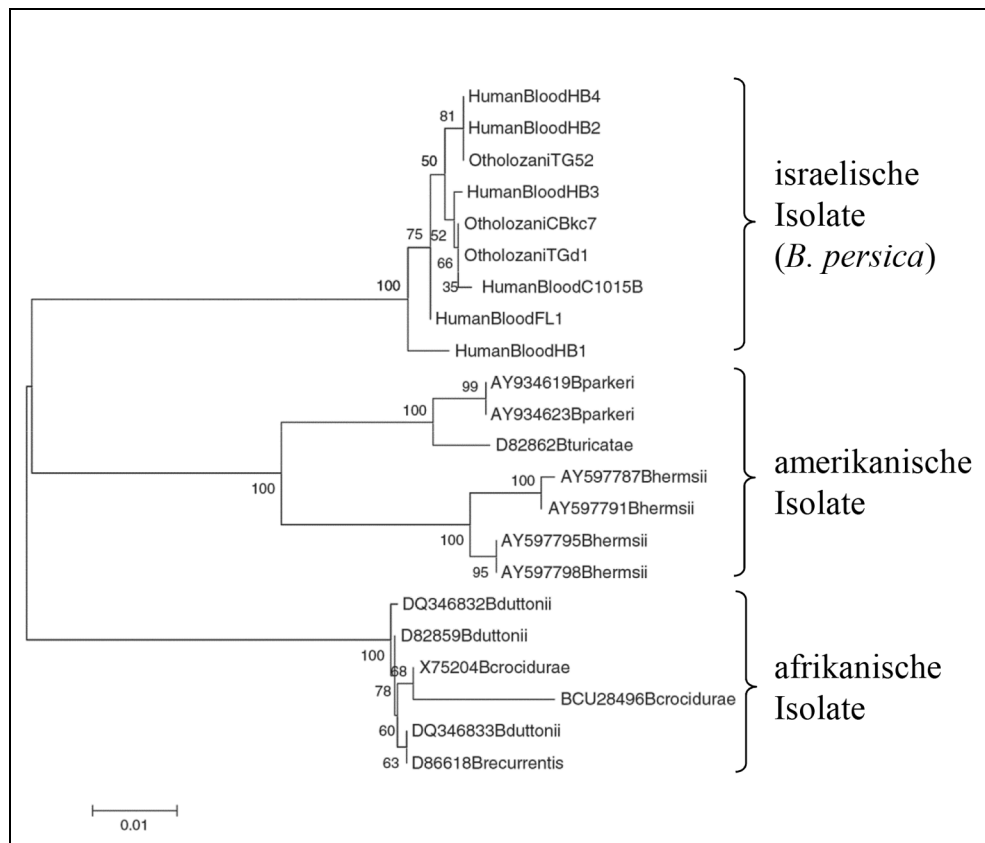


Abbildung 1: Phylogenetischer Baum auf Grundlage der Sequenzen des Flagellin-B-Genes von verschiedenen Rückfallfieberborrelien

nach Assous et al. (ASSOUS et al., 2006), modifiziert

1.2 Vorkommen von Rückfallfieberborrelien

Der bedeutendste Erreger von Rückfallfieber in Nordamerika ist *B. hermsii*, wobei auch von *B. turicatae* und *B. parkeri* Gefahren ausgehen können (OGDEN et al., 2014). In Europa kann unter anderem *B. hispanica* in einigen Ländern des Mittelmeerraums gefunden werden. (REBAUDET et al., 2006). Des Weiteren wurde *B. miyamotoi* in Schildzecken detektiert, welche aus bestimmten Gebieten in Frankreich, Deutschland (RICHTER et al., 2003, 2013), Tschechien (RICHTER et al., 2012) und den Niederlanden (HOVIUS et al., 2013) stammten. In Zentralasien und im Mittleren Osten weist *B. persica* ein großes Verbreitungsgebiet auf (Abbildung 2) und wird für die meisten klinischen Fälle von Rückfallfieber verantwortlich gemacht (ASSOUS et al., 2009; SIDI et al., 2005; SAFDIE et al., 2010). Aber auch das Vorkommen von *B. caucasica*, *B. latyschewii*, *B. microti* und *B. baltazardi* wird in gewissen Regionen beschrieben (GOUBAU, 1984; AGHIGHI et al., 2007; KARIMI et al., 1979).

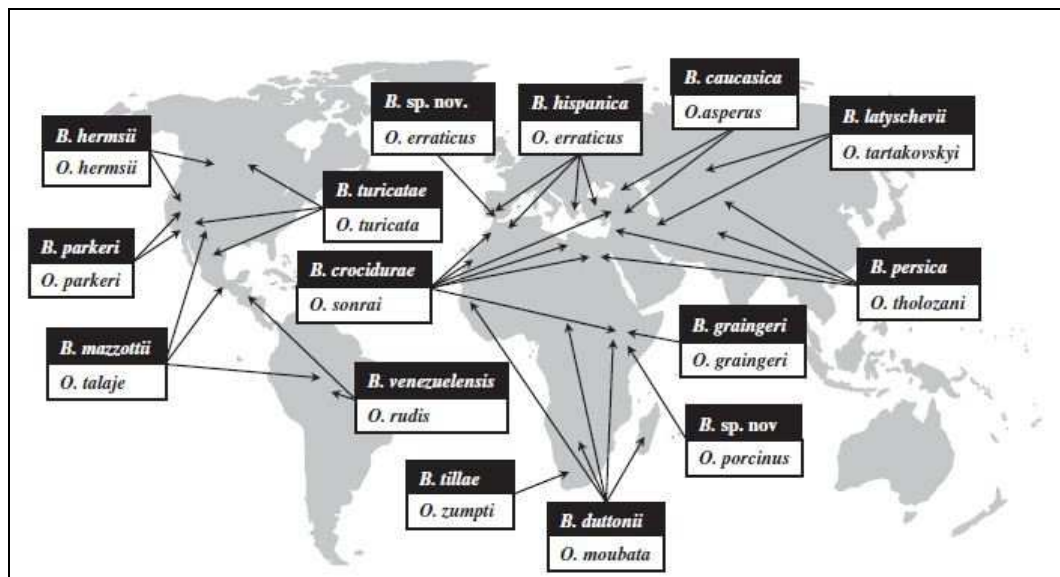


Abbildung 2: Verbreitungsgebiet von Rückfallfieberborrelien und deren *Ornithodoros*-Vektorspezies

nach Rebaudet et al. (REBAUDET et al., 2006), Abbildung mit Genehmigung von John Wiley & Sons

1.3 Morphologische Eigenschaften

Borrelien sind helikal gewundene Bakterien (KARIMI et al., 1979). Die Morphologie verschiedener Borrelienspezies unterscheidet sich in Länge, Durchmesser, Gleichmäßigkeit und Enge der Windungen sowie Anzahl der periplasmatischen Flagellen (BARBOUR et al., 1986) (Abbildung 3).

Eine elektronenmikroskopische Studie von *B. persica*-Spirochäten zeigte, dass die Länge der Bakterienzellen zwischen 16 µm und 23 µm variieren kann und der maximale Zelldurchmesser bei 0,45 µm liegt. Die gleichmäßigen helikalen Windungen besitzen eine Wellenlänge von 2 µm und eine Amplitude von 0,35 µm, welche in Richtung Zellende abnimmt. Die Zellpole enden spitz. Die Anzahl der Flagellen pro Zellpol liegt bei 25 bis 30. Sie bilden Bündel, welche an den Zellenden über eine Strecke von 1,5 Wellenlängen entspringen, sich um den zytoplasmatischen Körper winden und in der Zellmitte überlappen. Der Durchmesser einer Flagelle beträgt ungefähr 10 nm. Der Durchmesser des zytoplasmatischen Körpers an seiner dicksten Stelle beträgt 0,25 µm. Der zytoplasmatischen Membran folgt eine Außenmembran (KARIMI et al., 1979), in welcher die Lipoproteine mit ihrem Lipidanteil verankert sind (BARBOUR et al., 2000). Eine regelmäßig strukturierte Oberflächenschicht bedeckt die Zelle (KARIMI et al., 1979).

Im Blutausstrich findet man Borrelien locker und unregelmäßig gewunden. Wenn sie in großer Anzahl vorliegen, kleben sie zusammen. In frischen Flüssigpräparationen bewegen sich Borrelien aktiv in eine Richtung durch Dreh- und Wellenbewegungen sowie durch Drehungen um die eigene Achse (Korkenzieherbewegung) oder seitliches Biegen (GOUBAU, 1984).

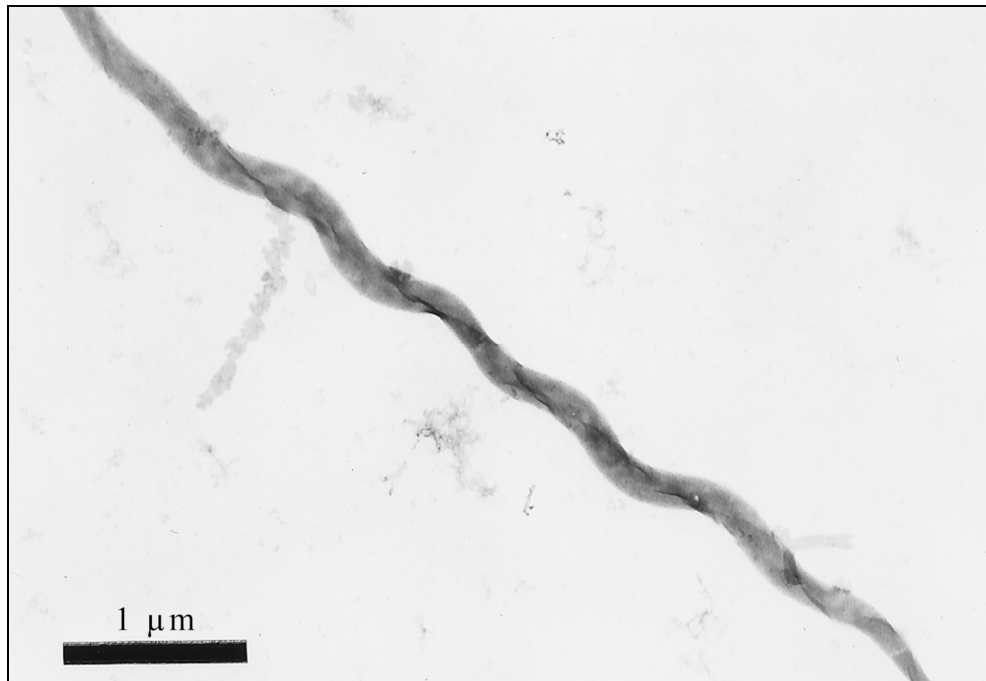


Abbildung 3: Elektronenmikroskopie von *B. hermsii*

nach Shang et al. (SHANG et al., 1998), modifiziert, Abbildung mit Genehmigung von der American Society for Microbiology

2 *Ornithodoros tholozani*

2.1 Taxonomie und Nomenklatur

Die Zeckenspezies *O. tholozani* gehört zum Stamm der Gliederfüßer (Arthropoda). Charakteristisch für diesen Stamm sind unter anderem der Besitz eines Außenskeletts, welches während der Entwicklung zum Adultstadium durch Häutung erneuert werden muss, sowie gegliederte Extremitäten mit echten Gelenken, Mundwerkzeuge und ein offenes Blutsystem mit Hämolymphe (DEPLAZES et al., 2013).

Taxonomie und Einordnung von *O. tholozani*:**Stamm:** Arthropoda**Unterstamm:** Amandibulata (Chelicerata)**Klasse:** Arachnida**Unterklasse:** Acari**Ordnung:** Ixodida**Familie:** Ixodidae**Familie:** Nuttalliellidae**Familie:** Argasidae**Gattung:** *Ornithodoros***Art:** *Ornithodoros tholozani*

basierend auf Deplazes et al. und Parola et al. (DEPLAZES et al., 2013; PAROLA et al., 2001)

2.2 Verbreitung von *Ornithodoros*-Zecken

Der Gattung *Ornithodoros* sind verschiedene Zeckenarten untergeordnet, welche jeweils in bestimmten Regionen der Erde vorkommen (Tabelle 1) (PAROLA et al., 2001).

Die Zeckenart *O. tholozani* weist ein großes Verbreitungsgebiet auf. Sie kommt unter anderem im Mittleren Osten, Zentralasien und Indien vor (ASSOUS et al., 2009), jedoch variiert ihr Auftreten in den untersuchten Gebieten. In einer iranischen Studie entdeckte man diese Spezies in 75 % der nach dem Zufallsprinzip ausgewählten Dörfer (n = 20, Provinz Kurdistan) (RAFINEJAD et al., 2012). In Khalkhal (Provinz Ardabil, Iran) waren unter den gesammelten Zecken (n = 1.421) 40,3 % *O. tholozani*-Exemplare. Dabei wurden deutlich mehr Zecken in tierischen als in menschlichen Behausungen entdeckt. Es wurden keine Zecken in Nagesternestern gefunden (14 untersuchte Nester) (ARSHI et al., 2002). In der iranischen Provinz Hamadan wurden unter den 4.805 gesammelten Zecken aus 53 zufällig ausgewählten Dörfern nur 85 (1,77 %) als *O. tholozani* identifiziert (VATANDOOST et al., 2003). In Takistan (Provinz Qazvin, Iran) war die Zahl der *O. tholozani*-Zecken in den Dörfern mit bereits gemeldeten Erkrankungsfällen 29-mal höher als in Dörfern, in denen noch kein Rückfallfieber ausgebrochen war (BARMAKI et al., 2010).

Tabelle 1: Verbreitungsgebiete verschiedener *Ornithodoros* spp.

Zeckenspezies	Verbreitung	Lebensraum	Wirte
<i>Ornithodoros moubata</i>	Ost-, Süd-, Zentralafrika	Schlamm-, Grashütten	hauptsächlich Menschen
<i>Ornithodoros erraticus sonrai</i>	Marokko, Libyen, Ägypten, Iran, Türkei, Senegal, Kenia, Tschad	Tierbaue in semiariden Gebieten und der Sahelzone	Nagetiere
<i>Ornithodoros erraticus erraticus</i>	Iberische Halbinsel, Nordafrika, Griechenland, Zypern, Syrien	Tierbaue	Nagetiere und andere kleine Säugetiere
<i>Ornithodoros verrucosus</i>	Irak, Kaukasien: Armenien, Aserbaidshan, Georgien	Tierbaue und Höhlen in Halbwüsten	Nagetiere
<i>Ornithodoros tartakovski</i>	Zentralasien, ehemalige Sowjetunion, Iran	Tierbaue, Nester	Nagetiere, Schildkröten
<i>Ornithodoros tholozani</i>	ehemalige Sowjetunion, Westchina, von Kaschmir bis Iran, Irak, Ägypten, Syrien, Israel, Indien	primitive Schutzhütten für Vieh, Höhlen: Tierbaue im Sand, staubige Böden in der Nähe des Höhleneingangs	Nagetiere, Schakale, Säugetiere in den Schutzhütten
<i>Ornithodoros hermsi</i>	westliche USA, Kanada	bewaldete, bergige Gebiete, Hohlräume in toten Bäumen, Blockhütten	Nagetiere
<i>Ornithodoros parkeri</i>	westliche USA	wie <i>O. hermsi</i> , in niedrigeren Höhenlagen	Nagetiere
<i>Ornithodoros talaje</i>	südliche USA, Mexiko, Guatemala, Zentral- und Südamerika	Tierbaue, Nester, Höhlen	Fledermäuse, Vögel (Hühner), Kleinsäuger (Nagetiere)

basierend auf Parola et al. (PAROLA et al., 2001)

2.3 Lebensweise

Charakteristisch für Lederzecken sind die kurzen Blutmahlzeiten an ihren Wirten (20 bis 30 min), mehrere Nymphenstadien und eine generelle Langlebigkeit (bis zu 10 Jahre (PAROLA et al., 2001)). Eine Blutmahlzeit ist nötig, damit die Zecke sich häuten kann (CUTLER, 2010). Bei einer Mahlzeit konzentrieren die Coxaldrüsen das eingesaugte Blut und sezernieren die Coxalflüssigkeit während und nach dem Saugakt. Der Saugakt der Zecken ist in der Regel für den Wirt schmerzfrei, weshalb gerade die unreifen Stadien aufgrund ihrer geringen Größe vom Menschen häufig nicht bemerkt werden (PAROLA et al., 2001; RAFINEJAD et al., 2012). Begleittiere und Nutztiere werden ebenso befallen wie der Mensch. Verschiedene Arten von Hörnchen und Mäusen werden als natürlich vorkommende Wirte für *Ornithodoros*-Zecken vermutet. Fledermäuse und Vögel könnten für die Verbreitung dieser Zecken in entferntere Regionen von Bedeutung sein (CUTLER, 2010).

Die Spezies *O. tholozani* (Abbildung 4) bevorzugt ein spezielles Mikroklima.



Abbildung 4: *O. tholozani*-Zecke

nach Assous et al. (ASSOUS et al., 2006), modifiziert; Darstellung von *O. tholozani* in der ventralen (A) und dorsalen (B) Ansicht

Eine Luftfeuchte von 70 bis 80 %, Temperaturen von 17 bis 25 °C und schwaches Licht sind ihre idealen Lebensbedingungen. Diese findet die Zecke in Höhlen, alten Ruinen und Ausgrabungsstätten, wo sie sich in Nischen und Ritzen versteckt oder sich im Boden verbirgt (ASSOUS et al., 2009). In den nördlichen Verbrei-

tungsgebieten kommt die Lederzecke auch in Häusern und Ställen vor (ASSOUS et al., 2009; ARSHI et al., 2002; RAFINEJAD et al., 2012).

2.4 Vektorfunktion und Infektionsrate

Borrelien können in der freien Umwelt nicht überleben. Sie werden von einem Gliederfüßler, der als Vektor dient, auf einen Wirbeltierwirt übertragen (GREENE et al., 2012). Dabei scheinen verschiedene Spezies der Rückfallfieberborrelien spezifisch für ihre bestimmte Zeckenart zu sein (PAROLA et al., 2001) (Abbildung 2). Deshalb ist eine Überlappung der Gebiete erkennbar, in denen eine gewisse Zeckenart vorkommt und durch eine bestimmte Borrelienart verursachte Erkrankungen mit Rückfallfieber auftreten (ASSOUS et al., 2009; REBAUDET et al., 2006).

Die Spezies *B. persica* kann nicht nur Menschen (DSCHUNKOWSKY, 1913), sondern auch Tiere infizieren (RAFINEJAD et al., 2011; BANETH et al., 2016). Die Übertragung erfolgt beim Saugakt der Zecke an ihrem Wirt (RAFINEJAD et al., 2011). Dabei dringen die Bakterien über infiziertes Sekret der Speicheldrüse oder Coxaldrüse in die gesetzte Läsion ein (PAROLA et al., 2001). Andere berichten, dass *O. tholozani* nur über den Speichel infiziert, da die Zecke nur eine geringe Menge an Coxalflüssigkeit sezerniert oder den Wirt bereits vor Ausscheidung verlassen hat (GOUBAU, 1984). In der Zeckenpopulation selbst wird *B. persica* sowohl transovariell als auch transstadial übertragen (PAROLA et al., 2001).

In Studien aus dem Iran wurden die Zecken in nach dem Zufallsprinzip ausgewählten Dörfern gesammelt (ARSHI et al., 2002; VATANDOOST et al., 2003; AGHIGHI et al., 2007; MASOUMI ASL et al., 2009; RAFINEJAD et al., 2012). Dabei variierte ihre Infektionsrate mit *B. persica*. Masoumi Asl et al. gaben an, dass 8,8 % der gesammelten *O. tholozani*-Zecken aus den Provinzen Hamadan und Qazvin mit *B. persica* infiziert waren (MASOUMI ASL et al., 2009), wohingegen in einer anderen Studie aus Hamadan nur 3,7 % von 82 gesammelten *O. tholozani*-Zecken mit *B. persica* infiziert waren (VATANDOOST et al., 2003). Die Infektionsrate der untersuchten Zecken, gesammelt in Qazvin, betrug 8,82 % (von 231 Zecken) (AGHIGHI et al., 2007) bzw. 16,7 % (von 95 Zecken) (BARMAKI et al., 2010). Die Anzahl der dokumentierten Neuerkrankungen schien in einer Studie von Moemenbellah-Fard et al. mit der Menge an gefangen

Zecken positiv zu korrelieren. Es war ein Höhepunkt in den Sommer- und Herbstmonaten zu verzeichnen (MOEMENBELLAH-FARD et al., 2009).

In Israel variierte die Infektionsrate der Zecken mit *B. persica* zwischen < 2 bis 40 % je nachdem aus welcher Region sie stammten (ASSOUS et al., 2006).

3 Epidemiologie – Rückfallfieber im Iran und in Israel

Das iranische Gesundheitsministerium berichtete von 201 Rückfallfieberfällen im Jahr 2001, 205 Fällen im Jahr 2002 und 471 Fällen im Jahr 2003 (RAFINEJAD et al., 2012; AGHIGHI et al., 2007). Insgesamt wurden in den Jahren 1997 bis 2006 1.415 Fälle im gesamten Land erfasst, wobei nur 18 von 30 Provinzen betroffen waren. Dabei handelte es sich bei den Regionen mit hoher Inzidenz um die Provinzen Ardabil, Hamadan, Zandschan und Kurdistan (MASOUMI ASL et al., 2009). In der Provinz Kurdistan, gelegen im westlichen Teil vom Iran, ist das Rückfallfieber als endemisch eingestuft (RAFINEJAD et al., 2012). In einer epidemiologischen Studie von Rafinejad et al. wurden in dieser Provinz 97 Fälle von humanen Rückfallfieber in den Jahren 2000 bis 2004 dokumentiert. Allein 92 Fälle wurden aus dem Verwaltungsbezirk Bijar verzeichnet. 90,7 % der Erkrankungen traten in ländlichen Regionen auf, wohingegen die restlichen 9,3 % der Betroffenen aus Städten kamen, meist mit dem Hintergrund ländliche Regionen bereist zu haben. 71,1 % der Erkrankten waren Kinder und Jugendliche bis zum Alter von 19 Jahren (RAFINEJAD et al., 2012). Eine Studie von Kassiri et al. erfasste in der Provinz Kurdistan zusätzlich 41 Fälle in den Jahren 2005 bis 2006 (Insgesamt wurden 138 Fälle von 2000 bis 2006 dokumentiert). Die meisten traten im Jahr 2003 auf (26,1 %). Die Studie erfasste 50,7 % Frauen und 49,3 % Männer unter den Erkrankten. Vor allem in den Sommer- und Herbstmonaten kam es zu Neuerkrankungen (Juli bis Oktober: 82,6 %) (KASSIRI et al., 2014a). Dennoch tritt das Rückfallfieber ganzjährig im Iran auf (MASOUMI ASL et al., 2009). 86,2 % der Erkrankten waren jünger als 30 Jahre. Es war eine breite Schicht in der Bevölkerung betroffen. Neben Schülern (37,7 %) erkrankten hauptsächlich Hausfrauen (25,4 %) und Kinder (19,6 %). Die Personen lebten vor allem in schlammbedeckten, alten Häusern mit engem Kontakt zu Kühen und Schafen (81,9 %) in ländlichen Regionen (KASSIRI et al., 2014a). Von 2007 bis 2008 wurden im Verwaltungsbezirk Bijar 11 Patientenfälle dokumentiert. Das entsprach einer Inzidenzrate von 0,1/1.000 (KASSIRI et al., 2014b). Epidemiologische Daten aus

unterschiedlichen Studien, welche im Iran durchgeführt wurden, sind vergleichend in Tabelle 2 zusammengefasst.

In Israel wurden zwischen 1980 und 2002 184 Fälle von Rückfallfieber, eine in diesem Land meldepflichtige Erkrankung, dokumentiert. Diese traten in ganz Israel auf, südlich begrenzt durch das Kibbuz Sede Boker, welches sich im nördlichen Teil der Wüste Negev befindet. Die durchschnittliche Zahl der Neuerkrankungen pro Jahr sank von 14,2 (1980 bis 1984) auf 4,6 (1992 bis 2002). Zusätzlich kamen im Jahr 2003 acht Fälle und im Jahr 2004 fünf Fälle dazu. Rückfallfieber wird in diesem Land auch als Höhlenfieber (engl. cave fever) bezeichnet. 88 % der Orte, an denen sich Personen infiziert haben, waren Höhlen. Erkrankungen traten ganzjährig auf. Im Juli und August (Sommerferien in Israel) befanden sich unter allen Infizierten 75 % bzw. 92 % Jugendliche unter 18 Jahren (WILAMOWSKI et al., 2005). Sidi et al. werteten Berichte von Rückfallfiebererkrankungen in der Bevölkerung von 1971 bis 2003 und aus dem Militär von 1975 bis 2003 aus. Auch sie konnten zeigen, dass der Durchschnitt der jährlichen Inzidenz in der Bevölkerung sank (1975 bis 1985: 0,35/100.000, 1986 bis 2003: 0,11/100.000). Allerdings blieb unter den Soldaten die Rate an Neuerkrankungen in den Jahren 1983 bis 2003 relativ konstant (durchschnittlich 6,4 Fälle pro 100.000 Menschen jährlich). Das hohe Risiko für Soldaten basierte auf ihren Aktivitäten im Freien (beispielsweise langes Liegen am Boden). Die konstante Inzidenz der Soldaten lässt darauf schließen, dass Rückfallfieber in Israel immer noch endemisch ist und eine erhebliche Gefahr für die Menschen darstellt (SIDI et al., 2005).

Tabelle 2: Vergleich epidemiologischer Studien aus dem Iran

Parameter		Studie					
		Arshi et al.	Masoumi Asl et al.	Moemenbellah-Fard et al.	Rafinejad et al.	Kassiri et al. (a)	Kassiri et al. (b)
	Gesamtzahl	391	1.415	148	97	138	11
Altersgruppe	Kinder	33 % (< 5 Jahre)	51 % (≤ 10 Jahre)	16 % (< 5 Jahre)	27,8 % (0–9 Jahre)	23,9 % (0–9 Jahre)	45,5 % (0–9 Jahre)
	Jugendliche	kA	27 % (11–20 Jahre)	41 % (10–19 Jahre)	43,3 % (10–19 Jahre)	42 % (10–19 Jahre)	54,5 % (10–19 Jahre)
	Erwachsene	kA	22 % (> 20 Jahre)	30 % (≥ 20 Jahre)	28,9 % (≥ 20 Jahre)	34,1 % (≥ 20 Jahre)	0 %
Unterkunft	ländlich	84 %	92 %	kA	90,7 %	92 %	kA
	städtisch	kA	8 %	kA	9,3 %	kA	kA
	alte Häuser	70 %	kA	kA	86,8 %	81,9 %	72,7 %
	Viehbesitz	64 %	kA	kA	57 %	81,9 %	72,7 %

basierend auf Arshi et al., Masoumi Asl et al., Moemenbellah-Fard et al., Rafinejad et al. und Kassiri et al. (ARSHI et al., 2002; MASOUMI ASL et al., 2009; MOEMENBELLAH-FARD et al., 2009; RAFINEJAD et al., 2012; KASSIRI et al., 2014a, 2014b)

kA: keine Angabe

4 Klinik

Charakteristisch für das von Zecken übertragene Rückfallfieber (engl. tick-borne relapsing fever (TBRF)), welches unter anderem von *B. persica* hervorgerufen wird, sind wiederholt auftretende Fieberschübe, die mit unspezifischen Symptomen einhergehen können (ADLER et al., 1937; RAFINEJAD et al., 2012; KUTSUNA et al., 2013; KASSIRI et al., 2014a). Dabei sind die Fieberattacken durch fieber- und beschwerdefreie Phasen voneinander abgegrenzt (COLIN DE VERDIÈRE et al., 2011; KUTSUNA et al., 2013).

Dokumentationen über klinische Fälle einer mit wiederkehrendem Fieber einhergehenden Erkrankung im Iran wurden bereits 1882 angefertigt (THOLOZAN, 1882). Im Jahr 1937 veröffentlichte Adler eine umfassende Beschreibung der Krankheitsbilder beim Menschen, die er anhand von 45 klinischen Fällen in Palästina erstellte. Die Inkubationszeit der Erkrankung lag zwischen fünf und neun Tagen. Die Anzahl der Fieberattacken schwankte zwischen einem und 14 Schüben. Allerdings hatten rund 70 % der Patienten weniger als fünf Attacken. Die Dauer der Fieberphasen lag zwischen drei Stunden und vier Tagen. Das klinische Bild variierte zwischen den Betroffenen und sogar zwischen den einzelnen Attacken derselben Person. Die Krankheit scheint kein einheitliches klinisches Bild zu haben, außer dem Auftreten von Fieber und Spirochäten im Blut während einer Attacke (ADLER et al., 1937). Die am häufigsten berichteten Symptome neben Fieber sind Schüttelfrost und Kopfschmerzen. Weitere Symptome können unter anderem Übelkeit oder Erbrechen, Schwitzen, abdominaler Schmerz, Gelenkschmerz, Husten, Lichtempfindlichkeit und Nasenbluten sein (Tabelle 3) (ARSHI et al., 2002). In der Fallsammlung von Adler traten bei zwei Personen ophthalmologische und bei einem Erkrankten neurologische Beschwerden auf. Der Betroffene litt an einer Neuritis des Ischiasnervs (ADLER et al., 1937). Im Allgemeinen sind jedoch neurologische Symptome in Verbindung mit einer *B. persica*-Infektion als selten anzusehen (CADAVID et al., 1998). Ein akutes Lungenversagen (engl. acute respiratory distress syndrome (ARDS)) wurde bei einem Mann in Israel diagnostiziert. Das war der erste beschriebene Fall von ARDS in Zusammenhang mit von Zecken übertragenem Rückfallfieber, der außerhalb der USA auftrat und in Verbindung mit einer *B. persica*-Infektion stand (YOSSEPOWITCH et al., 2012).

Neben klinischen Untersuchungen der Patienten können Blutuntersuchungen

durchgeführt werden. Daraus können Laborbefunde wie Leukozytose, hohe Erythrozytensedimentationsrate und Anämie resultieren. Allerdings ist beispielsweise die Anämie ein verbreiteter Befund unter dem iranischen Volk (ARSHI et al., 2002).

Tabelle 3: Symptome des von Zecken übertragenen Rückfallfiebers

		Studie	
		Arshi et al.	Kassiri et al.
Gesamtzahl der untersuchten Fälle		391	138
Symptome	Fieber	93,3 %	100 %
	Schüttelfrost	86,2 %	92,8 %
	Kopfschmerzen	85,9 %	76,1 %
	Übelkeit/Erbrechen	64,2 %	47,8 %
	Schwitzen	64,1 %	60,9 %
	abdominaler Schmerz	57,4 %	58,0 %
	Gelenkschmerz	47,7 %	29,0 %
	Husten	24,9 %	20,3 %
	Lichtempfindlichkeit	18,5 %	16,7 %
	Nasenbluten	9,2 %	10,9 %

Häufigkeiten für das Auftreten verschiedener Symptome basierend auf den iranischen Studien von Arshi et al. und Kassiri et al. (ARSHI et al., 2002; KASSIRI et al., 2014a). Sonstige Symptome waren Ikterus, Hämaturie, Petechien, sklerale Kongestion (ARSHI et al., 2002) sowie Myalgie und Nervosität (KASSIRI et al., 2014a).

4.1 Fallbeispiel Mensch

Einen ausführlichen Bericht veröffentlichten Colin de Verdière et al. über einen Patienten, der nach einem Besuch in Usbekistan und Tadschikistan nach Frankreich zurückkehrte. Der 32-jährige Mann suchte aufgrund wiederkehrender Fieberepisoden das Saint-Louis-Krankenhaus in Paris auf. Er unternahm zuvor eine Wanderung durch besagte Länder und übernachtete in einem Zelt. Am letzten Tag seiner Reise hatte er bereits 39,5 °C Fieber, welches mit keinen weiteren Symptomen einherging und nach fünf Tagen wieder verschwand. Vier Tage später durchlitt er eine weitere Fieberphase, welche einen Tag andauerte. Die dritte, vierte und fünfte Fieberwelle trat jeweils nach zwei Tagen auf und hielt 12 Stun-

den an. Die Laboruntersuchungen zeigten eine Lymphozytopenie, Thrombozytopenie und einen Anstieg des C-reaktiven Proteins. In den fieberfreien Phasen ergaben ärztliche Untersuchungen keine klinischen Veränderungen. Der Mann konnte sich weder an einen Zeckenstich erinnern noch fand man Hautläsionen. Blutausstriche erbrachten keine Hinweise auf *Plasmodium* spp. oder *Borrelia* spp. Jedoch wurden durch eine quantitative Buffy-Coat-Analyse Spirochäten nachgewiesen, welche mittels molekularen Nachweismethoden als *B. persica* identifiziert werden konnten. Die Behandlung erfolgte mit 200 mg Doxycyclin pro Tag über eine Dauer von 10 Tagen. Daraufhin erholte sich der Mann (COLIN DE VERDIÈRE et al., 2011).

Als Differentialdiagnosen können Malaria, Septikämie, Typhus, Leptospirose, Arbovirus- oder andere virale Infektionen in Betracht gezogen werden (VAN DAM et al., 1999). Aufgrund dieses breiten Spektrums an möglichen Diagnosen wird die Rückfallfiebererkrankung bei heimkehrenden Reisenden oft erst spät erkannt und behandelt (KUTSUNA et al., 2013; VAN DAM et al., 1999).

4.2 Erkrankungen beim Tier

In einem Fallbeispiel aus Teheran (Iran) wurde ein junger Hund mit Unwohlsein, Diarrhö, Anorexie und Pusteln in einer Tierklinik vorgestellt. Bei der klinischen Untersuchung ergaben sich weitere Befunde wie Fieber und ikterische sowie schmerzempfindliche Schleimhäute. Blutuntersuchungen zeigten eine schwere regenerative Anämie, Neutrophilie, Thrombozytopenie und massive Spirochätämie. Eine genaue Charakterisierung der Borrelienspezies blieb in diesem Fall aus (ROSTAMI et al., 2011). In einer aktuellen Veröffentlichung aus dem Iran wurde der klinische Fall eines zwei Wochen alten Welpen vorgestellt. Neben Anorexie, Durchfall und Erbrechen wurde des Weiteren Fieber, Dehydration, Entzündung der submandibulären Lymphknoten sowie blasse Schleimhäute festgestellt. Das Blutbild bestätigte eine Anämie und offenbarte zusätzlich eine Neutrophilie. Im nach Giemsa-gefärbten dünnen Blutausstrich zeigten sich Spirochäten, welche mittels molekularen Nachweises als *B. persica* identifiziert wurden (SHIRANI et al., 2016).

In Israel wurde *B. persica* bei einem Hund, einer Katze und einem Krallenenaffen nachgewiesen. Diese Tiere stammten aus drei unterschiedlichen Regionen des Landes. Sie zeigten Lethargie sowie Anorexie und litten außerdem unter Anämie,

Thrombozytopenie sowie einer massiven Bakteriämie. Nach antibiotischer Behandlung überlebten Hund und Katze, wohingegen der Affe verstarb (BANETH et al., 2004). Eine aktuelle Veröffentlichung aus Israel, welche die Klinik von erkrankten Katzen und Hunden untersuchte, bestätigte die bereits genannten Befunde. Des Weiteren wurde das Auftreten von Fieber während einer *B. persica*-Infektion häufiger bei Hunden (vier von fünf) als bei Katzen (eine von fünf) festgestellt (BANETH et al., 2016).

5 Genetik und Immunevasion

Die Erkrankung des Menschen mit Rückfallfieber ist geprägt von sich wiederholenden Fieberschüben, welche durch beschwerde- und fieberfreie Intervalle unterbrochen werden. Dabei gehen die Fieberattacken mit einer detektierbaren Spirochätämie einher (BARBOUR, 1990). Jede neue Welle ist geprägt von der Präsenz neuer Serotypen. Der Wirt produziert Antikörper gegen eine Serotyppopulation. Folglich werden alte Populationen durch neue Serotypen ersetzt, die sich in der Zwischenzeit bilden konnten (STOENNER et al., 1982). Die serotypspezifischen Proteine werden als variable Hauptproteine (engl. variable major proteins (Vmps)) bezeichnet (BARBOUR et al., 1982, 1990). Die Proteine lassen sich weiter in die variablen großen Proteine (engl. variable large proteins (Vlps)) und die variablen kleinen Proteine (engl. variable small proteins (Vsps)) unterteilen (CADAVID et al., 1997). Sowohl mit immunfluoreszierenden monoklonalen Antikörpern als auch mit der Markierung der Proteine mit ¹²⁵Jod bei der Radioiodination wurde nachgewiesen, dass es sich bei diesen Proteinen um oberflächliche Antigene handelt (BARBOUR et al., 1982). Die Gene der Vmps liegen auf nicht exprimierten DNA-Abschnitten der linearen Borrelienplasmide. Eine Variation der Oberflächenantigene und somit ein Auftreten neuer Serotypen entsteht, wenn eines der stummen Gene dupliziert wird und das aktive Gen auf dem Expressionslokus, welcher auf einem anderen Plasmid liegt, ersetzt. Das stumme Gen fusioniert dabei mit der Expressionsstelle und wird für die Transkription aktiviert. Die Stelle der Fusion wird auch als Rekombinationsstelle bezeichnet (MEIER et al., 1985; PLASTERK et al., 1985). Ein *vmp*-Gen wird wahrscheinlich durch einen Promotor aktiviert, neben dem es sich nun befindet (BARBOUR et al., 1991). Des Weiteren wurde das Auftreten von Rekombination innerhalb eines Plasmids (RESTREPO et al., 1994a) und Punktmutationen beschrieben, wodurch es zu einer Veränderung der Aminosäurereihenfolge kommen kann (RESTREPO

et al., 1994b).

Die Vielfaltigkeit der Ausbildung von immundominanten Antigenen wird auch als antigenetische Variation bezeichnet (BARBOUR et al., 2000). Es können mindestens 24 antigenetische Varianten aus einer *B. hermsii*-Spirochäte entstehen. Diese bilden sich spontan und der Prozess wird wahrscheinlich nicht durch den Kontakt mit Antikörpern ausgelöst (STOENNER et al., 1982). Die Immunevasion der Rückfallfieberborrelien aufgrund antigenetischer Varianz erlaubt eine länger andauernde und wiederholte Bakteriämie. Dadurch wird die Chance einer horizontalen Übertragung erhöht, da durch die längere und wiederkehrende Präsenz der Borrelien im Blut die Aufnahmewahrscheinlichkeit durch die Zecke während ihres kurzen Saugaktes steigt (SCHWAN et al., 2002; PLASTERK et al., 1985).

6 Diagnostik

6.1 Direkter Erregernachweis im Blutaussstrich und Anreicherungsverfahren

Häufig wird die Diagnose einer Rückfallfieberborreliose über die Detektion von Borrelien im Blutaussstrich gestellt (DSCHUNKOWSKY, 1913; PAROLA et al., 2001; ASSOUS et al., 2009; SARIH et al., 2009; KUTSUNA et al., 2013). Diese Methode ist der Goldstandard (MOEMENBELLAH-FARD et al., 2009). Die Ausstriche werden aus peripheren Blutproben, welche in der Fieberphase der Patienten entnommen werden, angefertigt (KUTSUNA et al., 2013; SARIH et al., 2009) und mit Hilfe eines Dunkelfeldmikroskops oder nach Färbung (z. B. nach Giemsa) mittels konventioneller Mikroskopie untersucht (PAROLA et al., 2001; REBAUDET et al., 2006) (Abbildung 5).

Die Sensitivität der mikroskopischen Untersuchungsmethoden liegt bei rund 70 % (PAROLA et al., 2001) bis durchschnittlich 80 % (ASSOUS et al., 2009). Dabei ist der dicke Blutaussstrich 20-mal sensitiver als der dünne (REBAUDET et al., 2006). Die Morphologie der Borrelien ist allerdings im dünnen Ausstrich besser erhalten. Wenn frische Blutaussstriche mit Hilfe der Dunkelfeldmikroskopie untersucht werden, erhöht sich die Sensitivität, da die Spirochäten durch ihre Bewegung leichter detektiert werden können (ASSOUS et al., 2009). Einige Autoren demonstrierten, dass diese mikroskopischen Methoden nicht effizient genug sind, um eine Spirochätämie sicher zu identifizieren (ASSOUS et al., 2006; HALPERIN et al., 2006; NADDAF et al., 2011). Somit könnte die Erkrankung

unterdiagnostiziert sein, vor allem wenn die Proben zwischen den Fieberschüben genommen wurden oder im Fall von milden Infektionen, wenn keine oder nur wenige Borrelien im Blut vorhanden sind (NADDAF et al., 2011; RAFINEJAD et al., 2012). Schwierigkeiten ergeben sich ebenso, wenn der Untersucher nur geringe Erfahrung in der Mikroskopie vorweisen kann und bei vermehrter Durchführung von automatischen Differentialblutbildern (RAFINEJAD et al., 2012).

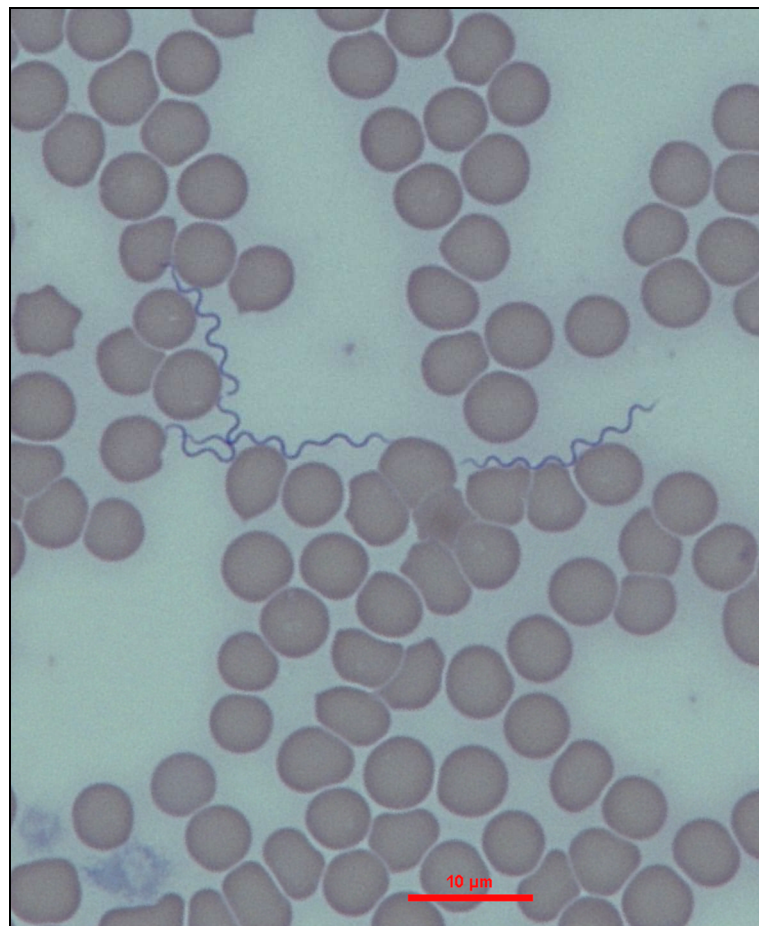


Abbildung 5: Borrelien im Blut einer erkrankten Katze

von Gad Baneth, Koret School of Veterinary Medicine, Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel; May-Grünwald-Giemsa-Färbung; Zwischen den Erythrozyten befinden sich die gewundenen Spirochäten.

In den Gebieten, in denen Rückfallfieber endemisch ist, sind kostenintensive Gerätschaften oft nicht verfügbar. Für die einfachen Labore in ländlichen Gesundheitszentren und Krankenhäusern gäbe es eine Alternativmethode, die mit minimalem Geräteaufwand betrieben werden kann und auf Anreicherung der Blutprobe durch vorherige Zentrifugation beruht. Dabei wird eine Probe von 10 ml Blut in einem ersten Schritt 5 Minuten bei 500 x g zentrifugiert. Der Überstand ist nun frei von Blutzellen und wird ein zweites Mal für 10 Minuten bei

5.000 x g zentrifugiert. Die Borrelien befinden sich nun im Pellet und dieses wird auf einem Objektträger ausgestrichen, nach Giemsa gefärbt und mit einer 1.000-fachen Vergrößerung mikroskopisch untersucht. Bei der Anreicherungs-methode konnten Borrelien bis zu einer Konzentration von 10 Bakterien pro ml Blut detektiert werden (LARSSON et al., 2008). In einem anderen Versuch konnten mit dieser Anreicherungs-methode keine Spirochäten unter einer Konzentration von 50 Bakterien pro ml nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu lag die Nachweisgrenze der nach Giemsa-gefärbten dicken Blutauss-triche bei einer Konzentration von 25.000 Bakterien pro ml Blut. Somit ist die Sensitivität der Anreicherungs-methode 500-mal höher als die des dicken Blutauss-triches (NADDAF et al., 2011).

6.2 Quantitative Buffy-Coat-Analyse

In einer Studie von van Dam et al. wurde die quantitative Buffy-Coat-Fluoreszenzanalyse (QBC-Fluoreszenzanalyse) als 100-mal sensitiver im Vergleich zum dicken Blutauss-trich und als einfache sowie schnelle Methode beschrieben. Das Blut wurde in QBC-Kapillarröhrchen gefüllt und mit einem fluoreszierenden Farbstoff (Acridinorange) versetzt. Nach Zentrifugation wurde der Buffy-Coat mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Zum Vergleich wurden dicke Blutauss-triche angefertigt und nach Giemsa gefärbt. Bei der QBC-Analyse bewerteten van Dam et al. 100 % der Blutproben mit einer Konzentration von 1.000 Borrelien pro ml positiv. Die Nachweisgrenze lag bei 100 Borrelien pro ml. Im Vergleich dazu konnten bei den dicken Blutauss-trichen 100 % der Proben mit einer Konzentration von 100.000 Borrelien pro ml Blut positiv bewertet werden und die Nachweisgrenze lag in dieser Studie bei 10.000 Borrelien pro ml (VAN DAM et al., 1999).

Die hohe Sensitivität der QBC-Methode wurde im Fallbericht von Colin de Verdière et al. praktisch bestätigt. Die ersten nach Giemsa-gefärbten dünnen und dicken Blutauss-triche eines Patienten wurden als negativ befunden, wohingegen die darauf folgende QBC-Analyse das Vorkommen einer Vielzahl von Spirochäten sichtbar machte (COLIN DE VERDIÈRE et al., 2011).

6.3 In-vitro-Kultivierung

Häufig genutzte Kulturmedien für Lyme- und Rückfallfieberborrelien sind das Barbour-Stoenner-Kelly-Medium (BSK) (BARBOUR et al., 1983), das Barbour-

Stoenner-Kelly-II-Medium (BSK-II) (BARBOUR, 1984), das BSK-H-Medium (POLLACK et al., 1993) und das modifizierte Kelly-Pettenkofer-Medium (MKP) (PREAC-MURSIC et al., 1986). Kultivierungsversuche von *B. persica* aus dem Blut israelischer Rückfallfieberpatienten in BSK-H-Medium blieben erfolglos (ASSOUS et al., 2006). Bei dem Kultivierungsversuch in BSK-Medium supplementiert mit 10 % Kaninchenserum konnten ebenso keine *B. persica*-Spirochäten angezüchtet werden (KUTSUNA et al., 2013), wohingegen sich *B. persica* in der Studie von Zamani et al. erfolgreich in BSK-Medium vermehrte, welches mit einer Konzentration von 10 % verschiedener Tiersera versetzt wurde. Meer-schweinchenserum, fetales Kälberserum und Kaninchenserum wurden dabei mit absteigendem Erfolg, der sich in den maximal erreichbaren Zellzahlen wieder-spiegelte, getestet (ZAMANI et al., 2014). Ebenso erzielten Elbir et al. ein Wachstum dieser Spirochäten unter der Verwendung von BSK-II-Medium mit 10 % Kaninchenserum (ELBIR et al., 2014). In einer neueren Studie wurde das modifizierte Kelly-Pettenkofer-Medium als Grundlage verwendet und zum Pettenkofer/LMU-Bp-Medium weiterentwickelt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Inhaltsstoffe des Pettenkofer/LMU-Bp-Mediums für die In-vitro-Kultivierung von *B. persica*

Zutaten	Menge
destilliertes Wasser	830 ml
HEPES-Natriumsalz	6 g
Bacto TM -Neopepton	3 g
D-(+)-Glukose	3 g
Natriumbicarbonat	2 g
Natriumpyruvat	0,8 g
Natriumcitrat-tribasic-dihydrat	0,7 g
N-Acetyl-D-Glucosamin	0,4 g
Kaninchenserum; hitzeinaktiviert (56 °C, 30 Minuten)	140 ml
CMRL-1066 (10 x), ohne Glutamin	100 ml
bovine Serumalbuminlösung, 35 % in 0,85 % Natriumchlorid, steril	35 ml
Gelatine aus Rinderhäuten; autoklaviert (115 °C, 15 Minuten)	14 g in 200 ml destil. Wasser

basierend auf Schwarzer et al. (SCHWARZER et al., 2015)

In diesem Medium, welches 10,7 % Kaninchenserum enthält, war es möglich, *B. persica* über 40 Passagen hinweg zu kultivieren. Dabei sind Zellzahlen von bis zu $5,2 \times 10^7$ Borrelien pro ml erfasst wurden (SCHWARZER et al., 2015).

6.4 In-vivo-Kultivierung

Für Forschungsarbeiten zum Beispiel im Bereich der Pathophysiologie und Immunologie oder auch für Stammidentifizierungen und als „Kultivierungsmedium“ werden Labortiere experimentell infiziert. Es kommen unter anderem Affen, Mäuse, Hamster, Meerschweinchen und Kaninchen zum Einsatz. Es ist außerdem möglich Patientenblut in Labortiere zu injizieren und deren Blutausschläge täglich für mindestens eine Woche auf Borrelien zu untersuchen. Mit dieser Methode könnten Spirochäten gefunden werden, wenn der direkte Blutausschlag des Patienten negativ war (SOUTHERN et al., 1969).

Für die In-vivo-Vermehrung von *B. persica* wurden bisher hauptsächlich Meerschweinchen eingesetzt, um zum einen den Erreger im Labor mittels Passagieren von Tier zu Tier erhalten zu können und zum anderen um Ausgangsmaterial für Forschungsarbeiten mit verschiedenen wissenschaftlichen Fragestellungen zu produzieren (KARIMI et al., 1979; MARTI RAS et al., 1996; NADDAF et al., 2011; OSHAGHI et al., 2011; RAFINEJAD et al., 2011). Des Weiteren wurden diese Tiere für die Speziesdifferenzierung verwendet (KARIMI et al., 1979) und um die Infektion eines Patienten nach vorheriger Inokulation seiner Blutprobe nachzuweisen (ADLER et al., 1937). Für den Einsatz von Mäusen bei *B. persica*-Untersuchungen wird auf das Kapitel II.9 „Mausmodelle“ verwiesen.

6.5 Molekulare Nachweismethoden

Molekulare Nachweismethoden gelten als die sensitivsten Analysemethoden. Mit diesen lässt sich nicht nur Borrelien-DNA mittels PCR nachweisen, sondern sie ermöglichen auch eine Identifikation der Borrelienspezies beispielsweise durch Sequenzierung oder Analyse von Restriktionsmustern (ASSOUS et al., 2009).

Halperin et al. entwickelten ein molekulares Nachweisverfahren, das eine sichere Diagnose einer Rückfallfieberinfektion ermöglicht. Die diagnostische PCR amplifizierte das Gen der Glycerophosphodiester-Phosphodiesterase (*glpQ*), welches hochkonserviert unter den Rückfallfieberborrelien ist. Dieser Test wies eine 100%ige Sensitivität und Spezifität auf. Allerdings waren nur Patientenproben positiv, die während einer Fieberphase entnommen wurden. Für die Abgrenzung

von *B. persica* von zwei anderen häufig vorkommenden Spezies der sogenannten Alten Welt wurden die positiv befundenen Proben in einer zusätzlichen PCR getestet. Hierfür wurden zum Vergleich die DNA-Proben von *B. recurrentis* und *B. crocidurae* eingesetzt und zwei Sets an Primerpaaren generiert: beide Primerpaare banden an die Sequenzen von *B. recurrentis* und *B. crocidurae*, wohingegen nur ein Primerpaar spezifisch an die *glpQ*-Sequenz von *B. persica* band und diese somit amplifizierte (HALPERIN et al., 2006). In anderen Studien wurden für die Generierung von Primern weitere Zielsequenzen wie zum Beispiel das Flagellin-B-Gen (ASSOUS et al., 2006) oder das 16S-rRNA-Gen (MARTI RAS et al., 1996) genutzt. Die Anwendung dieser 16S-rRNA-PCR ergab eine Sensitivität von 97 % bis 100 % bei dem Nachweis von *B. persica*-DNA aus experimentell infizierten Zecken (RAFINEJAD et al., 2011). Neben der Sequenzierung (HALPERIN et al., 2006) ist die Analyse von Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen (RFLPs) eine weitere Möglichkeit die Borrelienspezies zu identifizieren. Dabei werden die DNA-Proben nach Vervielfältigung beispielsweise des 16S-rRNA-Genes mittels PCR mit bestimmten Endonukleasen in Fragmente verdaut, im Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die Restriktionsmuster nach dem Sichtbarmachen mit Ethidiumbromid analysiert (MARTI RAS et al., 1996). Aufgrund ihrer hohen Sensitivität ist die PCR anfällig für Kreuzkontaminationen und könnte falsch-positive Ergebnisse generieren. Auch sind diese molekularen Nachweismethoden kostspielig und benötigen ein gut ausgestattetes Labor, welches in ländlichen Gesundheitszentren meist nicht vorhanden ist (NADDAF et al., 2011). Des Weiteren werden für einen Ansatz der DNA-Extraktion nur geringe Mengen im Mikroliterbereich von einer Blutprobe benötigt. Somit könnte der limitierende Faktor nicht die Sensitivität der PCR an sich, sondern das geringe Probenvolumen sein. Vor allem wenn sich zum Zeitpunkt der Entnahme nur wenige Spirochäten im Blut befinden. Es ließe sich die Anreicherungs-methode (siehe Kapitel II.6.1) mit einer anschließenden PCR kombinieren, um die Sensitivität noch weiter zu erhöhen (LARSSON et al., 2008).

6.6 Serologische Nachweismethoden

Um zwischen Lyme- und Rückfallfieberborreliose zu unterscheiden, kann auf Antikörper gegen die Glycerophosphodiester-Phosphodiesterase (GlpQ) untersucht werden. Dieses hochkonservierte immunreaktive Protein der Rückfallfieberborrelien kommt bei den Erregern der Lyme-Borreliose nicht vor. Somit

können die beiden Krankheitskomplexe serologisch differenziert und Rückfallfieber unabhängig von der ursächlichen Spezies diagnostiziert werden (SCHWAN et al., 1996). Bei der Nachweismethode sollten die Seren zuerst mit Hilfe eines Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) oder Immunfluoreszenztests (IFA) voruntersucht und die positiv befundenen Proben im Immunblot differenziert und bestätigt werden, um falsch-positive Ergebnisse aufgrund von Reaktionen unspezifischer Proteine im Screeningtest auszuschließen (DWORKIN et al., 2008; WOJCIECHOWSKA-KOSZKO et al., 2011).

Spezifische serologische Nachweisverfahren für *B. persica* sind nicht verfügbar. Des Weiteren können serologische Methoden nicht zwischen einer aktiven und überstandenen Infektion unterscheiden (ASSOUS et al., 2009).

7 Therapie

7.1 Antibiotische Behandlung

Die bevorzugte antibiotische Behandlung von Erwachsenen erfolgt mit Tetracyclin oder Doxycyclin. Alternativ können auch Erythromycin, Penicillin oder Ceftriaxon angewendet werden (KUTSUNA et al., 2013). Behandlungsstrategien mit verschiedenen Antibiotika sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Nach Gabe von Amoxicillin bei einer *B. crocidurae*-Infektion erholte sich eine Patientin zwar zunächst, es trat allerdings eine erneute Episode von Rückfallfieber auf. Erst die Behandlung mit Tetracyclin beendete ihre Erkrankung (VAN DAM et al., 1999). In einem Fallbericht aus Japan wurde einer Patientin, die an einer *B. persica*-Infektion litt, über 10 Tage zwei Mal täglich 100 mg Minocyclin verabreicht. Daraufhin kurierte sie vollständig (KUTSUNA et al., 2013).

Im Zusammenhang mit Antibiotikatherapien wird vom Auftreten der Jarisch-Herxheimer-Reaktion (JHR) berichtet (HASIN et al., 2006; GUERRIER et al., 2011). Für nähere Ausführungen über diese schwerwiegende Komplikation wird auf das Kapitel II.7.2 „Komplikationen – Jarisch-Herxheimer-Reaktion“ verwiesen.

Tabelle 5: Antibiotische Behandlungsstrategien bei einer humanen Rückfallfieberborreliose

Antibiotikum	Dosierung	Quelle
Chlortetracyclin (Aureomycin)	2–3 g täglich über 3–4 Tage	(BABUDIERI, 1957)
Doxycyclin	200 mg täglich über 10 Tage	(COLIN DE VERDIÈRE et al., 2011)
	100 mg 2-mal täglich über 10 Tage	(KUTSUNA et al., 2013)
Minocyclin	100 mg 2-mal täglich über 10 Tage	(KUTSUNA et al., 2013)
Tetracyclin	2 g täglich über 7 Tage	(GALUN et al., 1984)
	500 mg 4-mal täglich über 7 Tage	(VAN DAM et al., 1999)
	500 mg 4-mal täglich über 7–10 Tage	(ROSCOE et al., 2005)

Rostami et al. beschrieben einen Borreliosefall bei einem Welpen aus Teheran. Nach Gabe von 10 mg/kg Doxycyclin, welches zwei Mal täglich über 30 Tage per os verabreicht wurde, zeigten sich im Blut keine Spirochäten mehr und das Tier war geheilt. Die begleitende Therapie mit 30 mg/kg Prednisolon per os einmal täglich für sieben Tage sollte die Krankheitssymptome lindern und Schmerzen reduzieren (ROSTAMI et al., 2011). Ein anderer Welpen aus dem Iran, welcher nachweislich mit *B. persica* infiziert war, erhielt Ampicillin (20 mg/kg, 3-mal täglich über 10 Tage) und wurde aufgrund seines schlechten Allgemeinzustandes zusätzlich begleitend therapiert. Dabei wurden ihm Infusionen mit physiologischer Kochsalzlösung und 3,33%iger Glucose (20 ml/12 h), Metoclopramid (2 g/kg/Tag) und Vitamin-B-Komplex (1 ml/Tag) über drei Tage sowie eine intramuskuläre Injektion mit Vitamin B12 (0,5 mg, 1-mal pro Woche) über zwei Wochen verabreicht. Nach erneuter Vorstellung zwei Monate später war das Tier völlig gesund (SHIRANI et al., 2016).

7.2 Komplikationen – Jarisch-Herxheimer-Reaktion

Bei dieser Reaktion, die ebenso bei der antibiotischen Behandlung anderer Infektionserreger wie Treponemen (MEISLIN et al., 1976) und Leptospiren (VAUGHAN et al., 1994) beschrieben ist, können nach Therapiebeginn plötzlich Schüttelfrost, Fieber, Kopfschmerzen, Unwohlsein, Übelkeit und Erbrechen auf-

treten. Nach anfänglichem Steigen der Herzrate, des Blutdrucks und der Atemfrequenz kommt es zum Blutdruckabfall im Verlauf der Reaktion. Die JHR steht im zeitlichen Zusammenhang mit dem Verschwinden der Spirochäten aus der Blutzirkulation (SOUTHERN et al., 1969; WARRELL et al., 1983). Nach Gabe von Doxycyclin als therapeutische Maßnahme gegen klinisches TBRF traten bei 80 % der israelischen Patienten eine JHR auf (HASIN et al., 2006). Die vorherrschende Theorie über die Entstehung dieser Komplikation beinhaltet eine Reaktion des Körpers auf die Freisetzung und Zirkulation von Endotoxin (BRYCESON, 1976; POUND et al., 2005). Als präventive Maßnahme wurde in einer Studie die Verabreichung von Antikörpern gegen den Tumornekrosefaktor- α als vielversprechend eingestuft (FEKADE et al., 1996).

8 Prävention

Die Öffentlichkeit und die Ärzte sollten über die Epidemiologie und das klinische Bild des Rückfallfiebers aufgeklärt und Krankheitsfälle in den lokalen Gesundheitsämtern gemeldet werden (DWORKIN et al., 2008). Ärzte sollten aufmerksam sein, wenn Patienten mit wiederkehrendem Fieber vorstellig werden, welche aus endemischen Regionen zurückgereist sind (KUTSUNA et al., 2013).

Als Präventionsmaßnahmen sollten nagetier- und zeckenbefallene Wohnungen, Tierbauten sowie Höhlen gemieden werden. Des Weiteren wird zum Tragen von geeigneten Schuhen und Kleidung geraten. Zusätzlich können Repellentien wie Permethrin angewendet werden (ASSOUS et al., 2009; DWORKIN et al., 2008). Die Etablierung von Erhebungs- und Überwachungsprogrammen wird auch bei Hunden als erforderlich für die erfolgreiche Prävention und Kontrolle der Borrelienerkrankung angesehen (ROSTAMI et al., 2011).

8.1 Bekämpfung von Zecken

Generell ist eine Ausrottung von Zecken in den meisten Fällen kein realisierbares Ziel, da sich diese Parasiten aus angrenzenden Gebieten erneut etablieren können oder Wildtiere als Reservoir dienen. In Viehbeständen werden hauptsächlich Akarizide eingesetzt. Diese Substanzen sind toxisch und können Rückstände in Milch und Fleisch hinterlassen sowie Umweltverschmutzungen verursachen. Die Bekämpfung von Lederzecken in Geflügelbeständen erweist sich aufgrund des Versteckverhaltens der Parasiten in den Behausungen als besonders schwierig. Hunde können hingegen mit einem Zeckenhalsband geschützt werden

(JONGEJAN et al., 2004). Eine weitere Möglichkeit ist die biologische Bekämpfung. In einer Studie von Sewify et al. wurde eine Sporensuspension von *Metarhizium anisopliae* in Hühnerställen aufgebracht, die von *Argas persicargas persicus* befallen waren. Der entomopathogene Pilz erzielte nach drei Wochen eine Mortalität von 100 % (SEWIFY et al., 2001).

8.2 Prophylaktischer Einsatz von Antibiotika

Eine prophylaktische Anwendung von Antibiotika ist ebenfalls möglich, um dem Auftreten von TBRF entgegenzuwirken. In einer Doppelblindstudie von Hasin et al. wurde den Probanden nach Exposition in einem endemischen Gebiet Israels Doxycyclin verabreicht und dessen Wirksamkeit in Hinblick auf die Prävention von TBRF untersucht. Zu Beginn erhielten die Probanden 200 mg Doxycyclin und an den darauf folgenden vier Tagen wurde die Dosis auf 100 mg reduziert. Die Kontrollgruppe erhielt Placebos. Dabei entwickelten Personen aus der Behandlungsgruppe kein Rückfallfieber, wohingegen einige Teilnehmer aus der Placebogruppe erkrankten. Das ergab eine Wirksamkeit der Doxycyclinprophylaxe von 100 %. Aufgrund der Länge der Inkubationszeit sollten Patientenuntersuchung und Behandlungsbeginn frühzeitig erfolgen, um das Auftreten der Erkrankung zu verhindern. Eine JHR wurde während den prophylaktischen Antibiotikagaben nicht festgestellt (HASIN et al., 2006). Erfolge verzeichneten auch Galun et al. bei der prophylaktischen Behandlung mit Tetracyclin (1 g täglich über drei bis fünf Tage) (GALUN et al., 1984).

9 Mausmodelle

In der Erforschung von verschiedenen Spezies der Rückfallfieberborrelien wird die Maus häufig als geeignetes Tier angesehen, um im Modell unterschiedlichen wissenschaftlichen Fragestellungen nachzugehen. Dementsprechend ist in der Literatur eine Vielzahl von Studien mit diesen Nagern beschrieben (GARCIA-MONCO et al., 1997; NORDSTRAND et al., 2001; ALUGUPALLI et al., 2003; LARSSON et al., 2006, 2009).

Im Rahmen der Arbeiten kommen abhängig vom zu untersuchenden Sachverhalt immunkompetente (YOKOTA et al., 1997; LARSSON et al., 2006; BENOIT et al., 2010) oder immundefiziente Mäuse (CADAVID et al., 2001; LARSSON et al., 2009; BENOIT et al., 2010) zum Einsatz. Beispielsweise wurden für die Analyse der Immunantwort auf eine *B. duttonii*-Infektion immunkompetente BALB/c-

Mäuse verwendet, welche mit einer Dosis von 1×10^2 Borrelien intraperitoneal inokuliert wurden. Anschließend wurde die protektive Wirkung der produzierten Antikörperklassen und -unterklassen nach passiver Immunisierung naiver Mäuse untersucht (subkutane Injektion der Antikörperpräparation gefolgt von einer intraperitonealen Applikation von 1×10^2 Borrelien nach sechs Stunden). Im Gegensatz zu den Antikörpern IgG1, IgG2a und IgG2b wiesen die IgM- und IgG3-Antikörper starke protektive Aktivitäten auf (YOKOTA et al., 1997). In der Studie von Larsson et al. wurden ebenso immunkompetente Tiere genutzt. Den C57BL/6J-Mäusen wurden 1×10^5 Rückfallfieberborrelien verschiedener Spezies (*B. duttonii*, *B. turicatae*, *B. hermsii* oder *B. crocidurae*) subkutan injiziert, um zum einen die Verläufe der Spirochätämien in den akuten Infektionsphasen und zum anderen die Entstehung von latenten Gehirninfectionen nach dem Verschwinden der Borrelien aus dem Blut zu erforschen. Die Analyse der Persistenz der Borrelien im Gehirn wurde mit Hilfe eines Infektionstests durchgeführt, bei dem die Gehirne der infizierten Tiere homogenisiert und anschließend intraperitoneal in naive Mäuse injiziert wurden. Die Ergebnisse der Studie offenbarten, dass die *B. duttonii*-Infektion von allen vier Spezies die längste Präsenz im Blut sowie im Gehirn zeigte und dass eine latente Gehirninfection nach Immunsuppression mit Methylprednisolon bei drei von 11 Nagern erfolgreich zu einer aktiven Infektion reaktiviert werden konnte (LARSSON et al., 2006). In einer anderen Studie wurde unter Verwendung eines immunkompetenten Mausstamms (C3H/HeN) ein Meningitismodell etabliert, indem die Forscher eine neue Borrelienspezies, welche aus einem erkrankten spanischen Patienten isoliert wurde, mit einer Dosis von 1×10^5 intradermal injizierten. Die histologische Untersuchung der Mausgehirne zeigte, dass jedes Tier eine Meningitis hatte, da mononukleäre Zellinfiltrate mit variierendem histopathologischen Grad in den Leptomeningen und den Plexus choroidei aufgefunden werden konnten (GARCIA-MONCO et al., 1997). Für die Entwicklung des ersten Nicht-Primaten-Modells für *B. recurrentis* nutzen Larsson et al. dagegen immundefiziente Mäuse, welche für die In-vivo-Forschung eine praktischere Alternative zur Verwendung von Primaten darstellen. Nach subkutaner Injektion von 1×10^6 Borrelien konnten relativ milde, aber persistierende Infektionen in den immundefizienten Tieren erzeugt werden, wohingegen sich die beiden *B. recurrentis*-Stämme in den immunkompetenten BALB/c-Mäusen nicht durchsetzen konnten (LARSSON et al., 2009). Ebenso favorisierten Pennington et al. den Gebrauch von immundefizienten Mäusen bei

der Untersuchung von *B. turicatae*-Serotypen hinsichtlich Gelenkspathogenität. Nach intraperitonealer Applikation von 1×10^3 Borrelien konnte gezeigt werden, dass die Arthritiden, verursacht durch Serotyp B, stärker ausgeprägt waren als die, welche nach Serotyp-A-Injektion entstanden. Zusätzlich waren die Spirochätenkonzentrationen im Blut und in den Gelenken bei den mit Serotyp B infizierten Mäusen höher als bei den mit Serotyp A infizierten Tieren (PENNINGTON et al., 1997).

In Forschungsarbeiten, welche die Spezies *B. persica* untersuchten, wurden bisher hauptsächlich Meerschweinchen genutzt (siehe Kapitel II.6.4 „In-vivo-Kultivierung“). Aber es existieren dennoch Studien, bei denen Mäuse zum Einsatz kamen. Bereits 1954 untersuchte Babudieri das Rückfallfieber in Jordanien. Er inokulierte Blut von erkrankten Menschen in diese Nager und konnte somit die Diagnose auf von Zecken übertragenes Rückfallfieber stellen. Viele Tiere waren zwei bis fünf Tage nach der Injektion infiziert. Des Weiteren wollte er die Infektionsrate von gefangenen *O. tholozani*-Zecken bestimmen, indem er die zerstoßenen Parasiten in Mäuse injizierte. Doch die Infektion der Nager blieb aus. Eine geringe Infektionsrate wurde ermittelt, indem die Zecken zum Saugen direkt an Mäuse gesetzt wurden. Bei dieser Methode waren die Tiere nach vier bis fünf Tagen positiv. Indem Babudieri negative Zecken an positive Mäuse setzte, woraufhin sich die Parasiten infizierten, konnte er schließlich beweisen, dass *O. tholozani* als Spirochätenüberträger fungiert. In seinen Experimenten zeigten sich keine einheitlichen Muster der Spirochätämie in den individuellen Blutproben einzelner Tiere. Außerdem erkannte er, dass die Rückfallfieberborrelien in den Gehirnen der Mäuse überlebten (BABUDIERI, 1957). Im Jahr 2006 injizierten Assous et al. spirochätenhaltiges Blut von vier israelischen Patienten intraperitoneal in ICR-Mäuse und detektierten anschließend Borrelien am Tag vier oder sechs im Tierblut (ASSOUS et al., 2006). Schließlich verwendeten Elbir et al. immundefiziente Mäuse (CB17/Icr-Prkdc^{scid}/IcrIcoCrl) als „Starterkulturmedium“, um einen in vitro schlecht wachsenden *B. persica*-Stamm, welcher zuvor 20 Jahre bei -70 °C gelagert wurde, für eine anschließend erneute In-vitro-Kultivierung vorzubereiten. Diese Strategie erwies sich als erfolgreich (ELBIR et al., 2014).

Bis heute existieren nach bestem Wissen keine Veröffentlichungen über ein ausführlich charakterisiertes Infektionsmodell für *B. persica* in der Maus.

III PUBLIKATION



RESEARCH ARTICLE

Borrelia persica Infection in Immunocompetent Mice - A New Tool to Study the Infection Kinetics In Vivo

Sandra Schwarzer¹, Evelyn Overzier¹, Walter Hermanns², Gad Baneth³, Reinhard K. Straubinger^{1*}

1 Bacteriology and Mycology, Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany, **2** Institute of Veterinary Pathology, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany, **3** Koret School of Veterinary Medicine, Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel

* R.Straubinger@lmu.de



OPEN ACCESS

Citation: Schwarzer S, Overzier E, Hermanns W, Baneth G, Straubinger RK (2016) *Borrelia persica* Infection in Immunocompetent Mice - A New Tool to Study the Infection Kinetics In Vivo. PLoS Negl Trop Dis 10(2): e0004404. doi:10.1371/journal.pntd.0004404

Editor: Melissa J. Caimano, University of Connecticut Health Center, UNITED STATES

Received: October 21, 2015

Accepted: January 4, 2016

Published: February 18, 2016

Copyright: © 2016 Schwarzer et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Borrelia persica, a bacterium transmitted by the soft tick *Ornithodoros tholozani*, causes tick-borne relapsing fever in humans in the Middle East, Central Asia and the Indian peninsula. Immunocompetent C3H/HeOuJ mice were infected intradermally with *B. persica* at varying doses: 1×10^6 , 1×10^4 , 1×10^2 and 4×10^0 spirochetes/mouse. Subsequently, blood samples were collected and screened for the presence of *B. persica* DNA. Spirochetes were detected in all mice infected with 1×10^6 , 1×10^4 and 1×10^2 borrelia by real-time PCR targeting the *flaB* gene of the bacterium. Spirochetemia developed with a one- to two-day delay when 1×10^4 and 1×10^2 borrelia were inoculated. Mice injected with only four organisms were negative in all tests. No clinical signs were observed when infected mice were compared to negative control animals. Organs (heart, spleen, urinary bladder, tarsal joint, skin and brain) were tested for *B. persica*-specific DNA and cultured for the detection of viable spirochetes. Compiled data show that the target organs of *B. persica* infections are the brain and the skin. A newly developed serological two-tiered test system (ELISA and western blot) for the detection of murine IgM, IgG and IgA antibody titers against *B. persica* showed a vigorous antibody response of the mice during infection. In conclusion, the infection model described here for *B. persica* is a platform for in vivo studies to decipher the so far unexplored survival strategies of this *Borrelia* species.

Author Summary

The spirochete *Borrelia persica* is a tick-borne bacterium that is transmitted by the vector *Ornithodoros tholozani* to its vertebrate host in the Middle East, Central Asia and the Indian peninsula. Current migration of vast numbers of individuals from this area increases the likelihood that *B. persica* infections will be introduced into new geographic regions. After infection and distribution by the bloodstream, relapsing fever episodes occur in humans. Since no reliable in vivo tools have existed so far to study this organism,

a murine model was established in this study to characterize the infection kinetics in immunocompetent mice. Aspects of the potential infectivity of the laboratory strain and of potential clinical signs, spirochetemia and antibody response as well as organ tropism and histopathological reactions were studied. With the successful infection model presented here, further studies are conceivable in order to gain advanced insights into the pathogenesis of *B. persica* infection and to characterize in detail the host immune response mounted against the bacterium. We propose that this model could also be used for the development of new rapid diagnostic approaches to initiate or monitor treatment regimes in order to clear or prevent the infection with *B. persica*.

Introduction

Spirochetes of the genus *Borrelia* (*B.*) are vector-borne, spiral-shaped bacteria that can be divided into two functional groups [1]. One large group of spirochetes belongs to the *B. burgdorferi* sensu lato complex (e.g. *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bavariensis*). Lyme disease borreliae are transmitted by hard-shelled *Ixodes* ticks [2]. The second group includes the relapsing fever (RF) borreliae which spread primarily via soft ticks with an exception of *B. recurrentis* that is transmitted by the body louse (*Pediculus humanus*). Among others, *B. hermsii*, *B. duttonii* and also *B. persica* are tick-borne RF borreliae which induce tick-borne relapsing fever (TBRF) (reviewed in [3]). *B. persica* is transmitted by the soft tick *Ornithodoros tholozani* during blood meals [4]. These ticks are prevalent in areas such as the Middle East, Central Asia and the Indian peninsula and feed on humans as well as on animals (reviewed in [5]). Moreover, TBRF can occur in non-endemic countries due to travel of infected people [6, 7]. Clinically, the disease manifests with fever attacks in human patients related to high numbers of spirochetes in the blood circulation during fever episodes [8–10] and non-specific clinical signs such as chills, headache, nausea, vomiting, sweating, abdominal pain, arthralgia, cough and photophobia which may occur [9]. Rodhain reviewed as early as 1976 [11] that a high level of experimental pathogenicity of *B. persica* can be perceived in guinea pigs, hedgehogs and rabbits whereas lower levels seem to occur in monkeys, adult white mice and rats. So far primarily guinea pigs have been used to multiply *B. persica* [12–14] and just recently it was possible to maintain *B. persica* in vitro [14, 15]. However, for other RF borrelia species the mouse is usually considered to be the appropriate animal model [16–19] and Babudieri investigated relapsing fever in Jordan by injecting blood of diseased patients into mice in order to confirm TBRF spirochetosis [20]. The mice used in the experiment tested positive two to five days after injection. Furthermore, Babudieri studied the infection rate of captured *Ornithodoros tholozani* ticks. Squashed ticks were inoculated into mice, but infection was not initiated, while a very low infection rate was obtained when the ticks were allowed to feed directly on these animals. Spirochetes were not present constantly and uniformly in the mice's blood. In addition, the author mentioned that the spirochetes survived in the mice's brains. In 2006, Assous et al. inoculated intraperitoneally blood of TBRF patients from Israel into ICR mice and detected spirochetes in the mice's blood samples on day four as well as on day six of the experiment [21]. Since comprehensive data for *B. persica* in mice were not available, we aimed to establish and characterize in detail an infection model for *B. persica* in immunocompetent mice. Therefore, we infected intradermally 44 C3H/HeOuJ mice with *B. persica* strain LMU-C01. In order to gain insight into the infection with these TBRF spirochetes, we investigated (a) whether this laboratory strain of *B. persica* is able to establish an infection in immunocompetent mice; (b) whether the mice develop clinical signs; (c) when and in which quantity the spirochetes appear

in the blood circulation; (d) confirm that *B. persica* disseminates into organs and investigate the histopathological changes; (e) characterize the mice's immune response during infection; and (f) define the minimal dose necessary to infect animals. After compilation of all data, we came to the conclusion that the infection model described here is a reliable tool that can be used for further research studies.

Materials and Methods

B. persica in vitro cultivation

For this study, 100 μ l of thawed *B. persica* passages (strain LMU-C01, isolated from a cat in Israel; passage 2, 3.9×10^6 organisms/ml) were cultivated in Pettenkofer/LMU Bp medium as described previously [15]. Cultures were incubated for five days and viable bacteria were counted with a Petroff-Hausser counting chamber (Hausser Scientific, Horsham, Pennsylvania, USA). Bacteria suspensions were adjusted to the required cell concentration by dilution of cultures with plain medium.

Mice and intradermal injection of *B. persica*

In total, 54 six- to seven-week-old female C3H/HeOuJ mice (Charles River Wiga Deutschland GmbH, Sulzfeld, Germany) were kept in individually ventilated cages (ISOCage N System; Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg, Germany) at the animal facility of the Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, Ludwig-Maximilians-Universität (Munich, Germany). Animals were manipulated in laminar flow systems in order to sustain specific-pathogen-free conditions. The health status of all mice and the body temperature, which was measured with a subcutaneous transponder (IPTT-300 Temperature Transponders; Plexx B. V., PW Elst, Netherlands), were recorded twice a day.

Initially, 20 mice were exposed to 1×10^6 *B. persica* spirochetes in 100 μ l medium by intradermal injection into the shaven back. In addition, four animals were injected with 100 μ l medium alone and served as negative controls. The injection volume was divided into small portions (10 x 10 μ l), placed close to each other into the skin (~ 4 cm² area). For the dose finding study, eight mice per group were injected with *B. persica* suspensions with varying concentrations. Group #1: 1×10^4 spirochetes per mouse; group #2: 1×10^2 spirochetes per mouse; group #3: 4×10^0 spirochetes per mouse. Two additional animals in each group served as negative and infection/transmission controls.

Blood, plasma and serum samples

To study the kinetics of bacteremia and the development of specific antibodies post infection, blood samples were collected at preassigned intervals. Two drops of blood were collected in a Microvette 100 K3E (preparation K₃EDTA; Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Germany) by facial bleeding after cutting the skin with a 4-mm Goldenrod Animal Lancet (Braintree Scientific, Bio-Medical Instruments, Zöllnitz, Germany). The bleeding scheme was as follows: during the first two weeks each mouse was bled every second day. However, in order to collect data for each single day of the first 14-day interval, the group was divided into two equal subgroups and these subgroups were bled according to alternating schedules. After day 14, all animals were bled together once a week until the final days 49/50. The bleeding scheme for the dose finding study was: during the first 20 days, each animal was bled every second day. Subgroups were formed and bled according to alternating schedules to obtain blood samples for each experimental day. After day 20, blood samples were collected every second day up to the final days 30/31/32. Alternating schedules were applied to the subgroups (each mouse was bled every fourth day).

For DNA-extraction, 5 µl from each blood sample were transferred into a 1.5-ml safe-lock tube (Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Germany) and frozen at -30°C until used. Surplus blood samples of the regular blood collection from animals that had received 1×10^6 *B. persica* organisms were pooled subgroup-specific in another 1.5-ml safe-lock tube for plasma production. After euthanasia, a final blood sample of each mouse was collected in a micro tube (1.1ml Z-Gel; Sarstedt AG & Co.) for serum production. Plasma and serum preparation were done by a two-time centrifugation (Centrifuge 5430 R V 1.1, rotor FA-45-30-11; Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH) at $350 \times g$ for 10 min at 24°C. The supernatants were collected in a 1.5-ml safe-lock tube and were frozen at -30°C until serological analyses were performed.

B. persica DNA quantification in blood and DNA detection in tissue samples

AS3000 Maxwell 16 MDx Instrument and the Maxwell 16 LEV Blood DNA Kit (Promega GmbH, Mannheim, Germany) were used for DNA extraction from blood and tissue samples. In the case of blood: 5 µl thawed blood, 300 µl sterile phosphate-buffered saline (PBS), 300 µl lysis buffer and 30 µl Proteinase K were mixed. The following steps were done according to the manufacturer's technical manual # TM333 (Maxwell 16 LEV Blood DNA Kit and Maxwell 16 Buccal Swab LEV DNA Purification Kit Technical Manual; Promega GmbH). DNA was eluted in 60 µl elution buffer and frozen at -30°C. In the case of tissue: 200 µl of incubation buffer (Promega GmbH) were filled in a 1.5-ml safe-lock tube containing thawed tissue (weight less than 50 mg). Then, 200 µl lysis buffer and 30 µl Proteinase K were added and the tissue sample was squeezed and disrupted with a micro pestle (Faust Lab Science GmbH, Klettgau, Germany). Samples were incubated in a ThermoMixer comfort 5355 V 2.0 (Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH) at 56°C and 500 rpm overnight. Additional 200 µl of lysis buffer were added and DNA was extracted with the Maxwell 16 MDx Instrument. DNA was eluted and frozen as written above.

B. persica DNA was detected with a real-time quantitative PCR (qPCR) assay in a Mx3005P qPCR System (Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG, Böblingen, Germany). The primers and the probe were designed according to the *flaB* target gene of *B. persica* using the software Primer3Plus (Free Software Foundation, Inc., Boston, Massachusetts, USA; <http://primer3plus.com>; [22]). Synthesis of following sequences was carried out by Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany): Bp_*flaB*_fw 5'-GAG GGT GCT CAA CAA GCA A-3', Bp_*flaB*_p-robe 5'-FAM-AAA TCA GGA AGG AGT ACA ACC AGC AGC A-3'-TAM and Bp_*flaB*_re 5'-CAA CAG CAG TTG TAA CAT TAA CTG G-3'. The expected amplicon size was 106 base pairs. Real-time PCR was carried out in 96 Multiply PCR plate natural (Sarstedt AG & Co.) containing 1.2 µl of each primer (final concentration 600 nM), 0.8 µl of the probe (final concentration 200 nM), 10 µl GoTaq Probe qPCR Master Mix (2 x; Promega GmbH; final concentration 1 x, added CXR reference dye following the manufacturer's protocol) and 2.5 µl target DNA solution. The reaction volume was 20 µl in total and was pipetted in duplicate for each DNA sample. The amplification program was as follows: initial activation at 95°C for 5 min, 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 60 s and a final step at 25°C for 15 s. In each qPCR run a positive control (*B. persica* strain LMU-C01, P3), no template control (NTC, 2.5 µl nuclease-free water; Promega GmbH) and samples for calibration of the standard curve (serial dilution of *B. persica* DNA, P4) were included. According to the standard curve (considering slope, efficiency and R-squared value), the absolute spirochete number per ml mouse blood was calculated using the MxPro QPCR Software version 4.10 (Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG) based on threshold cycles (C_t). Graphs were constructed with the OriginPro 9.1 Software (Additive GmbH, Friedrichsdorf, Germany).

As regards tissue, additional to DNA of *B. persica flaB* gene mouse-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; TaqMan Gene Expression Assay, Mm99999915_g1, VIC dye-labeled MGB probe, 20 x; Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm, Germany) was detected to control the DNA content in the tissue sample. TaqMan Gene Expression Assay was used according to the manufacturer's recommendations. The reactions mix (total volume 20 μ l) contained 10 μ l GoTaq Probe qPCR Master Mix (Promega GmbH; final concentration 1 x, added CXR reference dye), 1 μ l of the TaqMan Gene Expression Assay (final concentration 1 x) and 2.5 μ l DNA solution. PCR conditions were as described above, with the exception of the initial activation step that was separated into two steps: 50°C for 2 min followed by 95°C for 10 min.

B. persica re-cultivation from tissue samples

At the end of the infection study with 1×10^6 borrelia per mouse, animals were euthanized at days 49/50 post infection. Tissue processing was carried out as described previously [23]. Heart, spleen, urinary bladder, left tarsal joint, skin from infection areal and brain were collected from each mouse and divided into two parts (brain into three parts). One part was put in a 1.5-ml safe-lock tube and frozen at -30°C for DNA-extraction. The other part was transferred into a second 1.5-ml safe-lock tube filled with 200 μ l of Pettenkofer/LMU Bp medium. Subsequently, the tissue was squeezed and disrupted with a micro pestle and the suspension was transferred into a 12-ml tube (Centrifuge Tube 12; TPP, Faust Lab Science GmbH) filled with 10 ml Pettenkofer/LMU Bp medium. The organ cultures were incubated at 37°C in humidified air for three weeks. Observation for viable mobile spirochetes was performed weekly using a dark-field microscope. The third part of the brain, right kidney and right tarsal joint were transferred into a 50-ml centrifuge tube (114x28mm, PP; Sarstedt AG & Co.) filled with 20 ml of 4% formalin and were stored at room temperature until histopathology analyses were carried out. For the dose finding study the skin, brain, right kidney and right tarsal joint were collected on final days 30/31/32 and prepared as described above.

Histopathology

Brain parts, right kidneys and right tarsal joints (in 4% formalin) from five infected mice (infection dose 1×10^6 *B. persica*/mouse) and one control animal were used for the histopathological evaluations. Parts of the brains and kidneys were embedded in paraffin and were cut into 2–3 μ l thin slices. The other parts of brains and kidneys as well as tarsal joints were embedded in plastic and sectioned into 1 μ l thin slices. After staining with hematoxylin and eosin (HE) as well as Giemsa, observations for histopathological changes were carried out under a bright-field microscope.

Antigen production and preparation for antibody detection

A low-passaged culture of *B. persica* (strain LMU-C01) was used for antigen production. The purified bacterial lysate was utilized to detect mouse antibodies in the serological two-tiered test system (ELISA and western blot). Spirochetes were first cultured as described elsewhere [15]. When bacteria reached the late exponential phase (after five days), 150 μ l were transferred into each of two 12-ml tubes (Centrifuge Tube 12; TPP, Faust Lab Science GmbH) containing 6 ml medium and were further incubated for three days. These 6-ml bacteria suspensions were transferred to a sterile glass bottle containing 1 l medium and incubated until late exponential phase of growth (five days of incubation). Antigen preparation was done via ultrasound disruption according to Töpfer et al. [24] and the centrifuged supernatant of the whole cell lysate was

stored at -80°C until used. Determination of protein concentration and quality control of the antigen solution was carried out as described previously [24].

Antibody detection with a kinetic ELISA

The microdilution plates (Nunc-Immuno Microwell Maxisorp C96; Thermo Scientific, VWR International GmbH, Ismaning, Germany) were coated with whole cell antigen lysate of *B. persica* at a concentration of $0.2\text{ }\mu\text{g}$ per well as described by Barth et al. [25]. Detection of specific antibodies against *B. persica* was done with a computer-assisted, kinetic-based ELISA after Shin et al. [26]. Serum and pooled plasma samples were diluted 1:100 in sample buffer containing PBS, 0.05% Tween 20 (neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Germany) and 2% non-fat dry milk (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Four control serum samples were added in each run. Peroxidase-conjugated goat IgG fraction to mouse immunoglobulins (IgG, IgA, IgM; MP Biomedicals, LLC, Heidelberg, Germany) were diluted 1:4,000 in sample buffer and used as the secondary antibody. As a final step, substrate (TMB Microwell Peroxidase Substrate Kit; KPL, medac GmbH, Wedel, Germany) was added and after 1 min 45 s the extinction of each well was read five times in 35-s intervals at 650 nm in a SpectraMax Plus 384 Microplate Reader (Molecular Devices (UK) Ltd, Wokingham, United Kingdom). Results were calculated with the SoftMax Pro software 5.3 (Molecular Devices (UK) Ltd). To standardize the sample evaluation and for the comparability of the plates of each run, the results of the samples were adjusted to the evaluated values of the control samples. Graphs were constructed with the OriginPro 9.1 Software (Additive GmbH).

Antibody visualization with western blots

For antigen preparation, three parts of antigen were mixed with one part of reducing sample buffer (Roti-Load 1; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany) and heated for 10 min at 90°C in a ThermoMixer comfort 5355 V 2.0 (Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH). The diluted antigen was loaded into a precast gel (4–15% Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Precast Gels, IPG well comb, 86 x 67 mm (W x L); Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany) and a protein weight ladder (Precision Plus Protein WesternC Standards; Bio-Rad Laboratories GmbH) was included separated from each other with a 5-mm wide polytetrafluoroethylene (PTFE) stick. Gel electrophoresis was performed with 1:10 diluted running buffer (10x Tris/Glycine/SDS Buffer; Bio-Rad Laboratories GmbH) in a Mini-PROTEAN Tetra cell (Bio-Rad Laboratories GmbH) at 250 V for 22 min. Western blot and immunodetection were done according to the Protein Blotting Guide (Bulletin #2895; Bio-Rad Laboratories GmbH) and a house-internal protocol as outlined below. Buffers and solutions were produced following recipes of the Protein Blotting Guide. Blotting of proteins onto a nitrocellulose membrane (MemBlot CN—Rolle, $0.45\text{ }\mu\text{m}$, 10 x 7.5 cm; membraPure, Bodenheim, Germany) was carried out at 30 V for 960 min using a Mini Trans-Blot module (Bio-Rad Laboratories GmbH) in Towbin Buffer. The membrane was washed with tris-buffered saline (TBS, $\text{pH} = 7.5$) for 7 min and blocked for 1 h at room temperature in 5% non-fat milk-TBS. Subsequently, the membrane was washed with TTBS twice for 7 min (0.05% Tween 20 in TBS) and subsequently cut into strips (3–4 mm wide). Serum and plasma samples were diluted 1:100 in 5% non-fat milk-TTBS and incubated with the membrane strips for 1 h at room temperature hhhhhh. Protein standard strips were incubated with plain 5% non-fat milk-TTBS. After washing (four times, 7 min, in TTBS), the strips were incubated with 1:1,000 diluted detection antibody in TTBS (peroxidase-conjugated goat IgG fraction to mouse immunoglobulins IgG, IgA, IgM; MP Biomedicals, LLC), and the strips with the protein standard were incubated with Streptactin solution (Precision Protein StrepTactin-HRP Conjugate; Bio-Rad Laboratories GmbH) for 1 h at room temperature, respectively. Strips were

washed four times with TTBS for 7 min. After a final wash step with TBS for 1 min, color development was achieved by adding substrate (Opti-4CN Substrate Kit; Bio-Rad Laboratories GmbH) and stopped after 4 min by washing in distilled water. Images were taken with the Cemi-Doc MP System and Image Lab Software Version 5.0 (Bio-Rad Laboratories GmbH).

Ethics statement

Mouse experiments were carried out according to the guidelines approved by the Animal Welfare Committee of the Sachgebiet 54, Regierung von Oberbayern (Munich, Germany). The animal care and use protocols adhere to the German Tierschutzgesetz, the Tierschutz-Versuchstierverordnung and the recommendations of GV-SOLAS.

Results

Kinetics of *B. persica* spirochetemia

For direct pathogen detection, DNA was extracted from murine blood samples and the *flaB* gene of *B. persica* was detected with a real-time PCR. Data are shown as box plots using a log₁₀-scale of the absolute spirochete numbers per ml blood (Y-axis) and plotted against the blood sampling days (X-axis; Fig 1A–1C).

When mice were inoculated intradermally with 1×10^6 *B. persica* organisms (Fig 1A), spirochetes were detectable in their blood starting one day after injection. Median spirochete concentration ranged from 4.80 to 6.59 (log₁₀ x organisms/ml) during the first 12 days. A substantial decline in detectable spirochete numbers was observed from day 12 to 14. The median spirochete numbers dropped from 4.80 to 0 (log₁₀ x organisms/ml). After day 14, the majority of the mice tested negative for spirochetes in the blood, while during the same period three mice showed reduced numbers of borrelia and only one of them produced a positive signal on the final day of the experiment. The highest spirochete burden observed in a blood sample of an individual mouse was 1.9×10^7 *B. persica*/ml. When less spirochetes were used for intradermal inoculation (1×10^4 and 1×10^2 *B. persica*/mouse), spirochetes appeared in the blood circulation of the mice with a delay compared to the experiment performed with 1×10^6 *B. persica*/mouse. When 1×10^4 *B. persica* organisms were injected (Fig 1B), the earliest spirochetes were detectable two days after inoculation. Three peaks in spirochete concentration were recorded until day 15 (median spirochete concentration ranged from 3.90 to 6.43; log₁₀ x organisms/ml) and then the spirochete number decreased from day 15 onwards (6.31 to 0; log₁₀ x organisms/ml). After day 16, the median spirochete concentration varied at a low level (1.60 to 4.21; log₁₀ x organisms/ml). The majority of the mice tested negative from day 26 onwards. The highest spirochete load observed in a blood sample of an individual mouse was 2.3×10^7 organisms/ml. When 1×10^2 *B. persica* organisms were injected (Fig 1C), spirochetes were detectable beginning on day 3. Varying spirochete numbers in blood were observed during the first 16 days of the experiment and from day 17 onwards the median number of spirochetes decreased substantially (from 5.28 to 2.01; log₁₀ x organisms/ml). Mice showed spirochetemia at a low level until day 20. Then, the majority of the animals tested negative. No signals for *flaB* DNA were recorded for mice that were exposed to only four *B. persica* organisms per mouse and from mice which served as negative controls.

In summary, intradermal injection of decreasing numbers of *B. persica* resulted in delayed appearance of the spirochetes in the blood of infected mice. After an initial fluctuation of the median spirochete concentration at a high level, a sudden decrease in spirochete numbers was observed in each group from day 13 to 18. The infection rate was 100% when mice were injected intradermally with doses of 1×10^6 (20/20), 1×10^4 (8/8) and 1×10^2 (8/8) *B. persica*/mouse. The lowest dose tested (four *B. persica*/mouse) did not result in infection of any mouse (0/8).

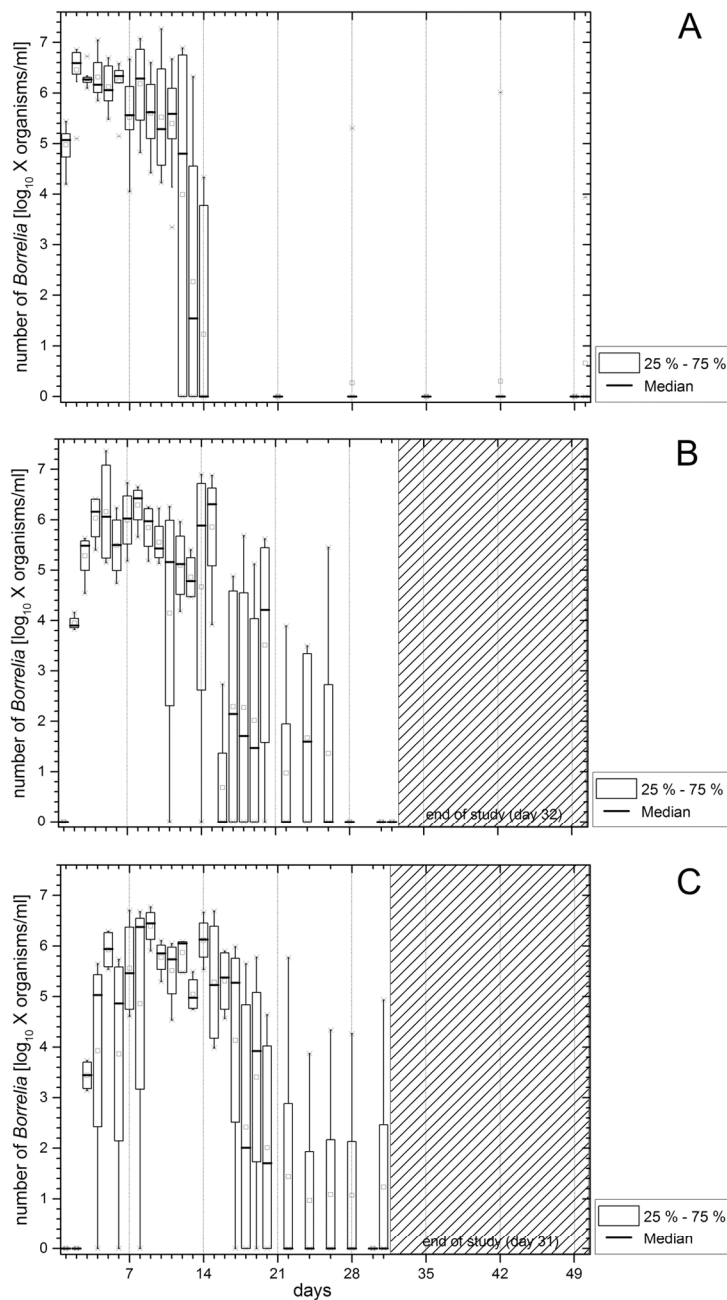


Fig 1. A-C. Spirochete burden in the blood. Results of real-time PCR detecting the *flaB* gene of *B. persica* in blood from C3H/HeOuj mice that had received 1×10^6 (Fig 1A), 1×10^4 (Fig 1B) or 1×10^2 (Fig 1C) *B. persica*/mouse. The absolute spirochete numbers in each blood sample (Y-axis, \log_{10} -scale) are plotted as box plots against the blood sampling days (X-axis).

doi:10.1371/journal.pntd.0004404.g001

When analyzed at the individual level, most animals showed two to three peaks of spirochetemia and only a few (3/36) produced one peak. Fig 2A–2C show the absolute spirochete numbers per ml blood of three selected mice. These individual animals, which received 1×10^6 *B. persica*/mouse, revealed three different relapse patterns. In terms of mouse #2 (Fig 2A), peak

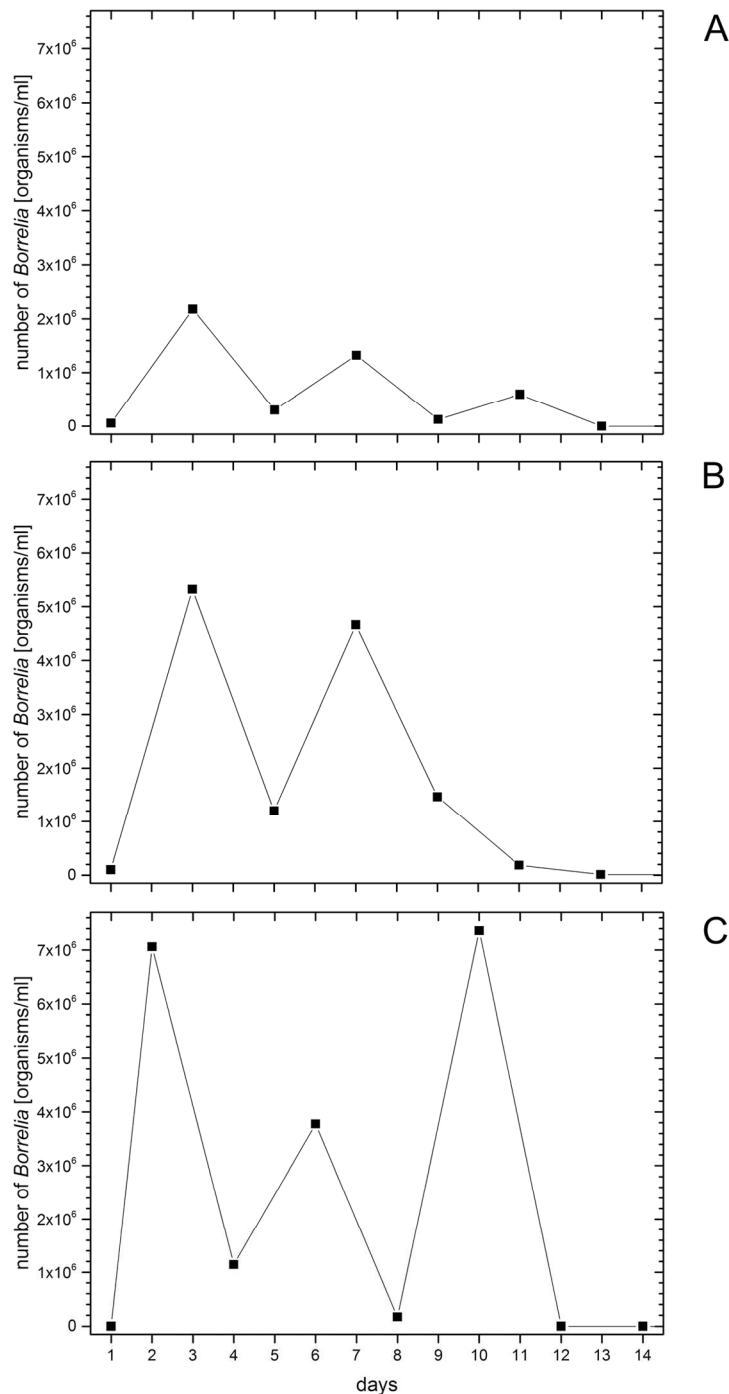


Fig 2. A-C. Individual relapse pattern. The absolute spirochete numbers per ml blood of three selected mice that had received 1×10^6 *B. persica*/mouse (Y-axis) are plotted against the blood sampling days (X-axis). Mouse two (Fig 2A) and mouse 12 (Fig 2B) were part of subgroup one; mouse 18 (Fig 2C) was part of subgroup two. During the first 14 days, subgroups were bled according to an alternating sample collection schedule.

doi:10.1371/journal.pntd.0004404.g002

spirochetemia intensities declined over time. First, spirochete numbers increased up to 2.2×10^6 organisms/ml on day 3. Subsequently, spirochetemia intensity decreased until day 5, rose up to 1.3×10^6 organisms/ml on day 7, declined again on day 9 and showed a last small peak of 6.0×10^5 organisms/ml on day 11. After that, the animal was negative until the end of the experiment. The lowest detectable number of spirochetes between the peaks was recorded on day 9 (1.2×10^5 organisms/ml). In mouse #12 (Fig 2B), two peaks (5.3×10^6 organisms/ml on day 3 and 4.7×10^6 organisms/ml on day 7) were noted. Between the peaks the detectable spirochete concentration was 1.2×10^6 organisms/ml. This mouse was negative after day 13. Fig 2C depicts the kinetics of spirochetemia in mouse #18: the first high peak with 7.1×10^6 organisms/ml on day 2 was followed by a second low peak with 3.8×10^6 organisms/ml on day 6, which again was followed by a last high peak with 7.4×10^6 organisms/ml on day 10. Between the first and the second peak the lowest spirochete count was 1.1×10^6 organisms/ml on day 4, while only 1.7×10^5 organisms/ml were observed between the second and the third peak on day 8. This mouse also remained negative from day 12 onwards.

Interestingly, none of the infected mice showed any clinical signs or elevated temperatures during spirochetemia and the following periods when compared to negative control animals.

Re-cultivation and real-time PCR detection of *B. persica* in tissues

Tissue samples were collected from the skin around the infection area, heart, spleen, urinary bladder, left tarsal joint, and brain at the end of the infection experiment with 1×10^6 borrelia/mouse on days 49/50. Cultures with liquid medium were started to attempt the cultivation of the borrelia. The organ cultures were investigated for the presence of viable spirochetes under a dark-field microscope once a week over a period of three weeks. One week after initiating the cultures, at least some single borrelia organisms were observed in most brain cultures. After three weeks, 13 out of 20 observed brain samples were found positive with some cultures showing massive numbers of rapidly-moving spirochetes (Table 1). Three skin cultures were also observed as positive after three weeks. In total, 70% (14/20) of the infected mice tested positive by culture. By real-time PCR, 90% (18/20) of the infected mice tested positive for the *B. persica flaB* gene in tissue samples. In addition to 18 positive brain and three skin samples from 18 mice, one heart and one splenic sample of the same mouse were positive by real-time PCR (this mouse was also positive by blood real-time PCR performed on its final day of experiment). Control animals tested negative in both methods. According to the results, only brain and skin samples were investigated on the final days of the dose finding study. Spirochetes were seen in 87.5% (7/8; infection dose: 1×10^4 *B. persica*/mouse) and 100% (8/8; infection dose: 1×10^2 *B. persica*/mouse) of brain cultures. All tissue cultures of animals that had received four *B. persica*/mouse and all negative controls tested negative. Real-time PCR was 100% (8/8) positive for brain samples from mice infected with doses of 1×10^4 and 1×10^2 *B. persica*/mouse. None of the skin samples tested positive in both methods.

Histopathological findings

Five mice (inoculated with 1×10^6 *B. persica*/mouse) which were positive according to all other test methods were selected for histopathologic evaluation. A negative mouse served as a control. The paraffin-embedded slices of brains and kidneys as well as the plastic-embedded slices of brains and joints revealed no histopathological changes indicative for inflammatory responses. Two specimens of in plastic-embedded kidneys (one infected and the uninfected mouse) contained small scattered interstitial infiltrations of lymphocytes (mild interstitial non-suppurative focal nephritis).

Table 1. Organ dissemination of *B. persica* following inoculation with different doses of spirochetes.

Infection dose	n	Number of positive tissue samples and mice in culture/ <i>flaB</i> -qPCR							
		heart	spleen	bladder	joint	skin	brain	mice	mice in %
1×10^6	20	0/1	0/1	0/0	0/0	3/3	13/18	14/18	70/90
1×10^4	8	nd	nd	nd	nd	0/0	7/8	7/8	87.5/100
1×10^2	8	nd	nd	nd	nd	0/0	8/8	8/8	100/100
4×10^0	8	nd	nd	nd	nd	0/0	0/0	0/0	0/0

n, number of mice

nd, not done

doi:10.1371/journal.pntd.0004404.t001

Two-tiered test system (ELISA and western blot) for the detection of specific antibodies against *B. persica*

The specific antibody response against *B. persica* was measured with a kinetic ELISA and characterized by western blotting. Plasma samples of mice injected with 1×10^6 *B. persica*/mouse were collected and pooled according to subgroups from day 1 to 50 according to an alternating sample collection schedule. Plasma samples as well as individual final serum samples of all animals were tested with an ELISA for the detection of murine IgM, IgG and IgA antibodies. Antibody levels developed immediately after spirochete injection and rose to 381.6 KELA units until day 21. Antibody levels plateaued (416.4 to 479.5 KELA units) until day 50 (Fig 3A). Antibody levels of individual final serum samples are shown in Fig 3B. The highest antibody levels were obtained in animals injected with 1×10^6 *B. persica*/mouse on days 49/50 of the experiment. Mice exposed to 1×10^4 or 1×10^2 *B. persica*/mouse showed medium to high levels of specific antibodies, however their antibody levels were lower when compared to the high-dose exposed group on day 28 (pooled plasma samples). Sera of animals receiving only four *B. persica*/mouse and negative mice showed non-specific antibody responses.

Western blots of individual final sera from each infection dose group showed bands between 15 kDa and 100 kDa. The patterns of the infected mice were similar. Nevertheless, the lower antibody levels induced by the smaller infection doses were reflected in the intensities of the immunoblot bands. Negative controls and animals that had received four *B. persica*/mouse showed only non-specific bands at 25 kDa and 37 kDa (Fig 3C).

Discussion

A murine infection model for *B. persica* strain LMU-C01 was established in this study. Investigated parameters such as clinical signs, spirochete burden, target organs of infection, histopathology and antibody response should provide further insights into the development of TBRF. Intradermal infection was 100% successful for the infection doses of 1×10^6 , 1×10^4 and 1×10^2 spirochetes per mouse. The dose of four *B. persica* organisms per mouse did not initiate infection in any mouse. This seems contradictory to other studies in other RF species, in which infection succeeded with single spirochetes of *B. recurrentis* var. *turicatae* [27] and *B. hermsii* [28]. It seems as though the pathogenicity of different RF species or even isolated single strains is decisive for the minimal infection dose and for a successful infection in animals. Furthermore, the route of infection might be a crucial factor for the initiation of an infection. Whereas in other studies animals were infected intraperitoneally with different RF species [27, 28], mice were infected intradermally with *B. persica* in our study. It is possible that innate defense mechanisms involving the skin immune cells might kill off a certain number of injected spirochetes. This could be a reasonable explanation for the unsuccessful intradermal infection with the

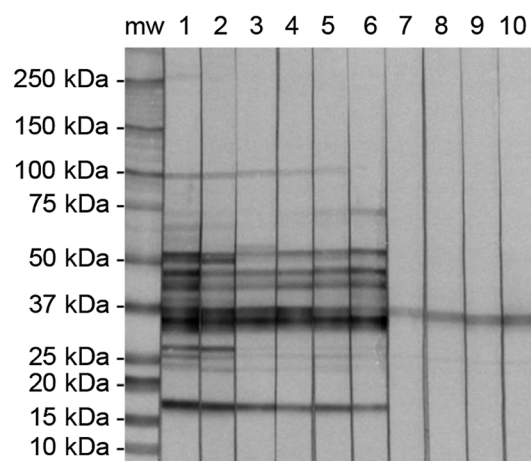
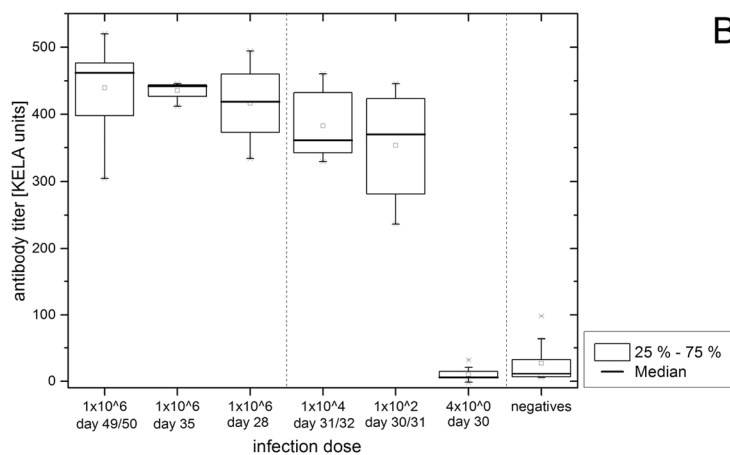
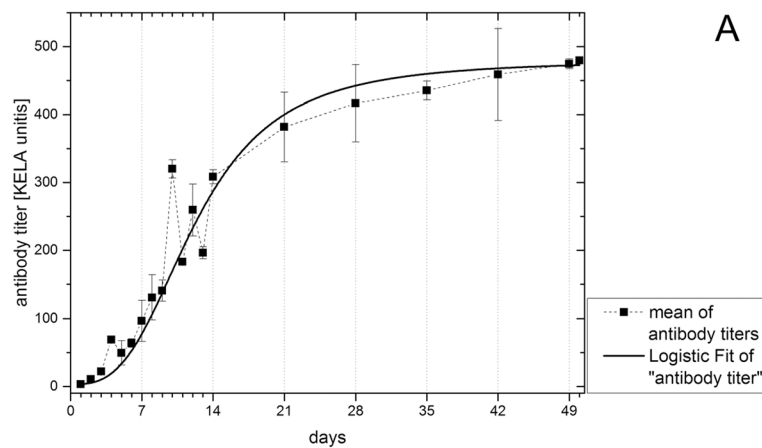


Fig 3. A-C. Antibody response against *B. persica*. Fig 3A. Antibody levels of pooled plasma samples (infection dose 1×10^6 *B. persica*/mouse). The mean (calculated out of the values of the subgroup-specific pooled plasma samples) and the standard deviation (Y-axis) are plotted against the blood sampling days (X-axis). The logistic fitting is shown as a continuous line. Fig 3B. Antibody levels of all experimental infection dose groups are shown as box plots; serum samples from final days and pooled plasma samples from days 35 and 28. Fig 3C. Western blot of final sera from two randomly selected mice out of each infection dose

group. Mw = molecular weight standard; 1, 2 = 1×10^6 *B. persica*/mouse; 3, 4 = 1×10^4 *B. persica*/mouse; 5, 6 = 1×10^2 *B. persica*/mouse; 7, 8 = 4×10^0 *B. persica*/mouse; 9, 10 = negative mice.

doi:10.1371/journal.pntd.0004404.g003

infection dose of only four *B. persica* per mouse. To our knowledge, the number of transmitted *B. persica* spirochetes by its vector *Ornithodoros tholozani* during the feeding process is unknown. However, one can speculate that the number of transmitted spirochetes is low, because of the short (minutes) blood meal of soft ticks [29] compared to hard ticks (several days of attachment on the host; [30]). Up to 1×10^4 *B. burgdorferi* organisms have been found in infected *Ixodes scapularis* (formerly *Ixodes dammini*) nymphal ticks after feeding on experimentally infected mice [31]. And yet it is unknown how many *B. burgdorferi* spirochetes are transmitted exactly during the feeding process from *Ixodes scapularis* to the host animal.

Spirochete burden in the blood of the infected animals was dependent on time and infection dose, and varied within the study groups displaying individual kinetics and extent of spirochetemia. High doses of inoculated *B. persica* induced a prompt appearance and an early high load of *B. persica* in the circulation, but had just a small influence on the maximal spirochete number. At the same time, these early large numbers of bacteria seem to have effectively stimulated the mice's immune response. Most of the mice in the group that had received 1×10^6 spirochetes per mouse had cleared spirochetemia by day 14, while the other two groups (1×10^4 and 1×10^2) controlled their spirochetemia days later or incompletely (compare Fig 1A, 1B and 1C). During days of investigation mice showed individual relapse patterns with varying numbers of bacteria (Fig 2A–2C). Such fluctuations in spirochete presence of individual mice were also seen in a study in Jordan [20]. In our study, every infected mouse showed one to three peaks of spirochetemia during the time course of blood sampling. Spirochetal numbers were low between the peaks, but still detectable by real-time PCR. To our knowledge, previous publications did not investigate the genetic mechanisms of the cyclic nature of *B. persica* at the level of variable major proteins (VMPs) as described for other RF borreliae [32]. However, VMP sequences have been identified for *B. persica* (e.g. variable large protein 18 under NCBI accession number: WP_024653159). Changes in VMPs expression are likely to be associated with recurring spirochetemia presented in this study. Further investigations are required to explore the VMPs and the underlying gene sequences for *B. persica* in more detail. The infection of our mice resulted in similar maximal bacteria numbers per ml when compared to an earlier study in guinea pigs ($\sim 6.8 \times 10^6$ *B. persica*/ml [13]) and so far, these animals have routinely been used to study and maintain *B. persica* [12–14]. Interestingly, the mouse strain used in this study (C3H/HeOuJ) did not show any clinical signs of disease. Other relapsing fever spirochetes were reported to have varying influences on temperature profiles in mice. For example, *B. microtti* induced fever in white mice (mouse strain unknown; [14]). Nevertheless, our infection model could be useful for research, because it allows comparative studies with other RF spirochetes in mice [16–19].

An interesting and crucial aspect of RF infections is the target tissues/organs, since these locations of spirochete persistence determine the final outcome of infection. Data obtained in this study clearly show that *B. persica* disseminates into the brains of mice (Table 1). Babudieri reported already in 1957 [20] that uncharacterized spirochete isolates from Jordan survived in mice's brains after experimental infection. Similarly, *B. crocidurae* and *B. duttoni* are known to infiltrate the brains of mice [18]. In humans, neurological symptoms due to *B. persica* infection are rarely reported (reviewed in [33]). It is, therefore, not surprising that the mice in this study did not display clinical signs of brain infection. Results of our histopathological investigations also support the assumption that short-term infections with *B. persica* not necessarily lead to apparent clinical signs. Whether the latent brain infection in immunocompetent mice remains

without any inflammatory response needs to be evaluated. Further studies aiming at long-term infections or at reactivation of the spirochetes as a result of immunosuppression could shed some light on this issue. Spirochetes were also detected in skin samples from five mice which received an inoculum of 1×10^6 organisms (two mice positive in culture, two mice positive for specific DNA, one mouse positive for both). Furthermore, one heart tissue sample and one splenic sample taken from the same mouse (1×10^6 *B. persica*/mouse) tested positive for *B. persica flaB* gene. Interestingly, the blood sample of this mouse collected on the final day of experiment (day 50) was also positive for *B. persica* DNA. Since the heart and the spleen are blood-rich organs, it is likely that these positive results indicate the presence of *B. persica* in the circulation rather than dissemination to these organs. The facts that the blood-rich organs of the other animals (infection dose 1×10^6 *B. persica*/mouse) were negative and that no borrelial DNA was detectable in the blood samples during the final days of the experiments suggest that brain and skin infections in these animals were real rather than due to contamination with spirochetemic blood.

Our histopathological investigations revealed mild interstitial non-suppurative focal nephritis in two kidneys from an infected and an uninfected mouse. It seems that the findings in our mice are an incidental event considering the changes in the kidney of the negative control animal. It is necessary to focus further investigations on this *B. persica* strain to clarify the non-conclusive histopathological results we had seen using a larger number of tissue samples or examining organs earlier post infection.

Comparing all tests used in this study, the highest detection rate for infection was achieved by antibody detection followed by real-time PCR performed on repeated blood samples collected during the first week of infection. Results of real-time PCRs performed on tissue samples (brains) also produced high detection rates. Yet, tissue cultivation is the most difficult and error prone method due to contamination with other fast-growing bacteria.

With the infection model presented here, further investigations are possible in order to gain advanced insights into the pathogenesis of *B. persica* infection and to characterize the host immune response mounted against in detail. We propose that this murine model could also be useful for the development of further diagnostic methods for treatment studies in order to detect, clear or prevent the infection with *B. persica*.

Conclusion

The results of this study show that *B. persica* strain LMU-C01 can be used to establish infection in immunocompetent C3H/HeOJ mice. The minimal infectious dose was between four and 1×10^2 *B. persica* organisms by intradermal inoculation in this study. Spirochetes were detected in the blood, brain and skin tissue samples thereby defining the brain and the skin as target organs of *B. persica* dissemination. The infection model presented in this study can serve as a platform for further ensuing in vivo investigations to gain new insights into the pathogenesis of *B. persica*.

Acknowledgments

Special thanks are addressed to Elisabeth Aschinger-Kirch as well as Anke Schiller for technical assistance and Liucun Liang for her gentle handling of the mice.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SS RKS. Performed the experiments: SS EO WH RKS. Analyzed the data: SS WH RKS. Contributed reagents/materials/analysis tools: WH GB RKS. Wrote the paper: SS EO WH GB RKS.

References

- Greene CE, Straubinger RK, Levy SA. Borreliosis. In: Greene CE, editor. Infectious diseases of the dog and cat. 4th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders; 2012. pp. 447–465.
- Cook MJ. Lyme borreliosis: a review of data on transmission time after tick attachment. Int J Gen Med. 2015; 8: 1–8. doi: [10.2147/IJGM.S73791](https://doi.org/10.2147/IJGM.S73791) PMID: [25565881](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25565881/)
- Goubau PF. Relapsing Fevers. A Review. Ann Soc Belg Méd Trop. 1984; 64: 335–364. PMID: [6397148](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6397148/)
- Rafinejad J, Choubdar N, Oshaghi MA, Piazak N, Satvat T, Mohtarami F, et al. Detection of *Borrelia persica* infection in *Ornithodoros tholozani* using PCR targeting *rrs* gene and xenodiagnosis. Iran J Public Health. 2011; 40: 138–145. PMID: [23113113](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23113113/)
- Assous MV, Wilamowski A. Relapsing fever borreliosis in Eurasia—forgotten, but certainly not gone! Clin Microbiol Infect. 2009; 15: 407–414. doi: [10.1111/j.1469-0691.2009.02767.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02767.x) PMID: [19489923](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19489923/)
- Colin de Verdière N, Hamane S, Assous MV, Sertour N, Ferquel E, Cornet M. Tickborne relapsing fever caused by *Borrelia persica*, Uzbekistan and Tajikistan. Emerg Infect Dis. 2011; 17: 1325–1327. doi: [10.3201/eid1707.101894](https://doi.org/10.3201/eid1707.101894) PMID: [21762608](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21762608/)
- Kutsuna S, Kawabata H, Kasahara K, Takano A, Mikasa K. Case Report: the first case of imported relapsing Fever in Japan. Am J Trop Med Hyg. 2013; 89: 460–461.
- Southern PM Jr, Sanford JP. Relapsing fever: a clinical and microbiological review. Medicine. 1969; 48: 129–149.
- Arshi S, Majidpoor A, Sadeghi H, Asmar M, Emdadi D, Derakhshan MH. Relapsing fever in Ardabil, a northwestern province of Iran. Arch Iran Med. 2002; 5: 141–145.
- Larsson C, Bergström S. A novel and simple method for laboratory diagnosis of relapsing fever borreliosis. Open Microbiol J. 2008; 2: 10–12. doi: [10.2174/1874285800802010010](https://doi.org/10.2174/1874285800802010010) PMID: [19088905](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19088905/)
- Rodhain F. *Borrelia* et fièvre récurrentes: aspects épidémiologique actuels. Bull Inst Pasteur. 1976; 74: 173–218.
- Marti Ras N, Lascola B, Postic D, Cutler SJ, Rodhain F, Baranton G, et al. Phylogenesis of relapsing fever *Borrelia* spp. Int J Syst Bacteriol. 1996; 46: 859–865. PMID: [8863409](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8863409/)
- Naddaf SR, Kishdehi M, Siavashi MR. Comparison of PCR-based diagnosis with centrifuged-based enrichment method for detection of *Borrelia persica* in animal blood samples. Iran J Arthropod Borne Dis. 2011; 5: 7–12. PMID: [22808405](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22808405/)
- Zamani Z, Arjmand M, Oreiz F, Soleimani M, Hosseini SH, Assmar M, et al. Culture of *Borrelia persica* and its flagellar antigen *in vitro*. Pak J Biol Sci. 2014; 17: 190–197. PMID: [24783801](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24783801/)
- Schwarzer S, Margos G, Overzier E, Fingerle V, Baneth G, Straubinger RK. *Borrelia persica*: *In vitro* cultivation and characterization via conventional PCR and multilocus sequence analysis of two strains isolated from a cat and ticks from Israel. Ticks Tick Borne Dis. 2015; 6: 751–757. doi: [10.1016/j.ttbdis.2015.06.012](https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.06.012) PMID: [26169028](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26169028/)
- Garcia-Monco JC, Miller NS, Backenson PB, Anda P, Benach JL. A mouse model of *Borrelia meningitis* after intradermal injection. J Infect Dis. 1997; 175: 1243–1245. PMID: [9129096](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9129096/)
- Nordstrand A, Shamaei-Tousi A, Ny A, Bergström S. Delayed invasion of the kidney and brain by *Borrelia crociduræ* in plasminogen-deficient mice. Infect Immun. 2001; 69: 5832–5839. PMID: [11500461](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11500461/)
- Larsson C, Andersson M, Pelkonen J, Guo BP, Nordstrand A, Bergström S. Persistent brain infection and disease reactivation in relapsing fever borreliosis. Microbes Infect. 2006; 8: 2213–2219. PMID: [16782384](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16782384/)
- Larsson C, Lundqvist J, van Rooijen N, Bergström S. A novel animal model of *Borrelia recurrentis* louse-borne relapsing fever borreliosis using immunodeficient mice. PLoS Negl Trop Dis. 2009; 3: e522. doi: [10.1371/journal.pntd.0000522](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000522) PMID: [19787030](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19787030/)
- Babudieri B. Relapsing fever in Jordan. Bull World Health Organ. 1957; 16: 911–928. PMID: [13472437](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13472437/)
- Assous MV, Wilamowski A, Bercovier H, Marva E. Molecular characterization of tickborne relapsing fever *Borrelia*, Israel. Emerg Infect Dis. 2006; 12: 1740–1743. PMID: [17283626](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17283626/)
- Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JAM. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. Nucleic Acids Res. 2007; 35: W71–74. PMID: [17485472](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17485472/)
- Krupka I, Knauer J, Lorentzen L, O'Connor TP, Saucier J, Straubinger RK. *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in Europe induce diverse immune responses against C₆ peptides in infected mice. Clin Vaccine Immunol. 2009; 16: 1546–1562. doi: [10.1128/CVI.00201-09](https://doi.org/10.1128/CVI.00201-09) PMID: [19726618](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19726618/)
- Töpfer KH, Straubinger RK. Characterization of the humoral immune response in dogs after vaccination against the Lyme borreliosis agent A study with five commercial vaccines using two different vaccination schedules. Vaccine. 2007; 25: 314–326. PMID: [16930782](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16930782/)

25. Barth C, Straubinger RK, Krupka I, Müller E, Sauter-Louis C, Hartmann K. Comparison of different diagnostic assays for the detection of *Borrelia burgdorferi*-specific antibodies in dogs. *Vet Clin Pathol*. 2014; 43: 496–504. doi: [10.1111/vcp.12213](https://doi.org/10.1111/vcp.12213) PMID: [25366257](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25366257/)
26. Shin SJ, Chang Y-F, Jacobson RH, Shaw E, Lauderdale T-L, Appel MJ, et al. Cross-reactivity between *B. burgdorferi* and other spirochetes affects specificity of serotests for detection of antibodies to the Lyme disease agent in dogs. *Vet Microbiol*. 1993; 36: 161–174. PMID: [8236777](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8236777/)
27. Schuhardt VT, Wilkerson M. Relapse phenomena in rats infected with single spirochetes (*Borrelia recurrentis* var. *turicatae*). *J Bacteriol*. 1951; 62: 215–219. PMID: [14861181](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14861181/)
28. Stoenner HG, Dodd T, Larsen C. Antigenic variation of *Borrelia hermsii*. *J Exp Med*. 1982; 156: 1297–1311. PMID: [7130900](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7130900/)
29. Cutler SJ. Relapsing fever—a forgotten disease revealed. *J Appl Microbiol*. 2010; 108: 1115–1122. doi: [10.1111/j.1365-2672.2009.04598.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04598.x) PMID: [19886891](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19886891/)
30. Piesman J, Mather TN, Sinsky RJ, Spielman A. Duration of tick attachment and *Borrelia burgdorferi* transmission. *J Clin Microbiol*. 1987; 25: 557–558. PMID: [3571459](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3571459/)
31. Burkot TR, Wirtz RA, Luft B, Piesman J. An OspA antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay for detecting North American isolates of *Borrelia burgdorferi* in larval and nymphal *Ixodes dammini*. *J Clin Microbiol*. 1993; 31: 272–278. PMID: [8432812](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8432812/)
32. Meier JT, Simon MI, Barbour AG. Antigenic variation is associated with DNA rearrangements in a relapsing fever borrelia. *Cell*. 1985; 41: 403–409. PMID: [2580643](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2580643/)
33. Cadavid D, Barbour AG. Neuroborreliosis during relapsing fever: review of the clinical manifestations, pathology, and treatment of infections in humans and experimental animals. *Clin Infect Dis*. 1998; 26: 151–164. PMID: [9455525](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9455525/)

IV DISKUSSION

Das Rückfallfieber, verursacht durch *B. persica*, ist im Mittleren Osten und Zentralasien verbreitet (ASSOUS et al., 2009). In einigen Ländern wie zum Beispiel Israel und dem Iran handelt es sich um eine endemische, meldepflichtige Erkrankung (SIDI et al., 2005; MASOUMI ASL et al., 2009), welche eine erhebliche gesundheitliche Gefährdung nicht nur für die einheimische Bevölkerung und das Militär (SIDI et al., 2005), sondern auch für Touristen darstellt, die bei ihrer Rückreise die Infektion in nicht endemische Länder mitführen können (KUTSUNA et al., 2013; COLIN DE VERDIÈRE et al., 2011). Deshalb sollte eine detaillierte Reisehistorie wichtiger Bestandteil der ärztlichen Anamnese sein und Rückfallfieber als Differentialdiagnose in Betracht gezogen werden, sobald ein Patient mit einer fiebrigen Erkrankung vorstellig wird (RAFINEJAD et al., 2012). Um weitere Einblicke in die Entstehung und den Verlauf von TBRF, verursacht durch *B. persica*, zu erlangen, ist die Erforschung des zugrundeliegenden Infektionserregers von großer Bedeutung.

Da momentan nach bestem Wissen noch kein geeignetes und ausführlich beschriebenes Mausmodell für die *B. persica*-Forschung existiert, war es Ziel der vorliegenden Studie, ein Infektionsmodell für *B. persica* in immunkompetenten Mäusen zu etablieren und im Detail zu charakterisieren. Um die Wahrscheinlichkeit eines Erregernachweises, vor allem in Hinblick auf die Dosisfindungsstudie, bei welcher der Einsatz von niedrig konzentrierten Inokula angestrebt wird, zu erhöhen, wurden sowohl direkte als auch indirekte Untersuchungsmethoden entwickelt. Zu den direkten Verfahren zählten der Nachweis von *B. persica*-DNA aus Blut- und Gewebeproben, welcher zusätzlich die Kinetik und Organ-dissemination der Borrelieninfektion charakterisieren sollte, sowie die Kultivierung von Gewebeproben im flüssigen Nährmedium für die Anzucht von lebensfähigen Erregern aus den Zielorganen. Der spezifische Antikörpernachweis sollte als eine der beiden indirekten Untersuchungsmethoden die erfolgreiche Infektion der immunkompetenten Mäuse mit *B. persica* bestätigen und deren Immunantwort veranschaulichen. Zusätzlich sollte die Histopathologie entzündliche Reaktionen in den Organen der Mäuse nachweisen, welche Folgeerscheinungen der Pathogenabwehr sein können. Entscheidende Grundlage für die Entwicklung der verwendeten Methoden war die erfolgreiche In-vitro-Anzucht der

Feldprobe im selbstentwickelten, flüssigen Kulturmedium Pettenkofer/LMU Bp (SCHWARZER et al., 2015). Durch dieses Medium waren eine zuverlässige, stabile und reproduzierbare Kultivierung des Erregers sowie die Produktion von großen Mengen an Antigen möglich, um darauf aufbauend die Nachweismethoden und das Infektionsmodell zu etablieren.

1 Weiterführende Methoden- und Ergebnisdiskussion unter Einbeziehung von Tiermodellen aus der Literatur

Im Experiment erwies sich das Auftreten von Kontaminationen in den Gewebekulturen als problematisch. Obwohl die Arbeiten in einer sterilen Werkbank stattfanden, die Instrumente nach Eröffnen der Haut sowie vor Entnahme der Gewebe abgeflammt wurden und die Proben zuerst in 70%igem Ethanol (Ethanol 96 %; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) und anschließend in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS; Rezeptur siehe Tabelle A1 im Anhang) gespült wurden, wiesen einige Gewebeproben Kontaminationen auf. Eine solche Verunreinigung wurde durch einen Farbumschlag des Mediums von pinkorange nach gelb angezeigt und zusätzlich konnte häufig eine Trübung der sonst klaren Nährlösung beobachtet werden (Abbildung 6). Die kontaminierten Kulturen und die nicht kontaminierten Kulturen wurden in regelmäßigen Abständen (einmal wöchentlich über drei Wochen) mit Hilfe eines Dunkelfeldmikroskops untersucht. In keiner der makroskopisch auffälligen Kulturen konnten bewegliche Borrelien nachgewiesen werden. Mögliche Ursachen für die Hemmung bzw. Unterdrückung des Wachstums und der Reproduktion der Spirochäten könnten ein Nährstoffentzug (STOENNER, 1974), verursacht durch die Kontaminanten, eine pH-Wertverschiebung in den sauren Bereich durch Stoffwechselabbauprodukte (KELLY, 1971) oder auch die Überwucherung der Zielkeime durch die Fremdkeime sein.

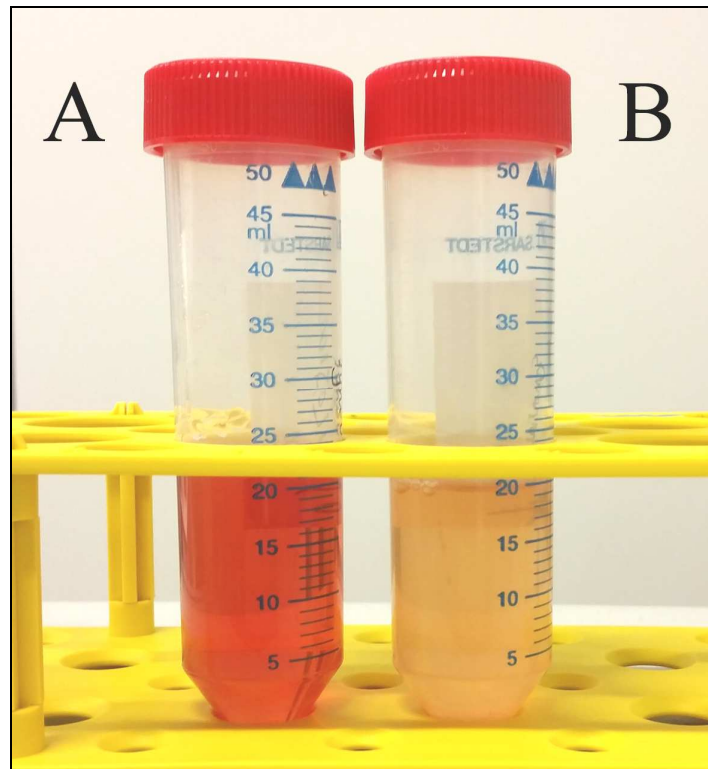


Abbildung 6: Zentrifugenröhrchen mit Pettenkofer/LMU-Bp-Medium

Nach einwöchiger Inkubation bei 37 °C im Feuchtbrutschrank zeigt Röhrchen A (Negativkontrolle) das normale Erscheinungsbild des Flüssignährmediums, wohingegen Röhrchen B eine starke Trübung und einen Farbumschlag nach gelb aufweist (pH-Indikator: Phenolrot), welche hinweisgebend für eine Kontamination sind.

Gelenk- und Hautproben waren am häufigsten von Kontaminationen betroffen. Nach zwei Wochen zeigten rund 67 % (Gelenk) und 72 % (Haut) dieser Gewebekulturen einen gelben Farbumschlag. Dagegen lagen die Kontaminationsraten der Kulturen, angesetzt aus Proben von inneren Organen, bei rund 31 % bis 46 % (Abbildung 7). Wahrscheinlich liegt die Ursache für das Auftreten der Kontaminationen trotz steriler Arbeitsweise in dem engen Kontakt dieser Gewebe zu der oberflächlichen Haut sowie zum Fell der Mäuse und der darauf befindlichen, natürlich vorkommenden Keimflora. Die Mäuse wurden unter spezifiziert pathogenfreien (SPF) Bedingungen gehalten. Einstreu, Futter und Wasser wurden vor Einsatz autoklaviert und die Luft durch HEPA-Filter gereinigt. Da es sich um SPF und nicht um gnotobiotische (keimfreie) Tiere handelt, kommen dennoch Bakterien auf der Haut und im Darm vor, die sich bei Kontakt mit dem nährstoffreichen Medium stark vermehren könnten. Bei der täglichen makroskopischen Untersuchung der Kulturen auf Veränderungen konnte einige Male ein Farbumschlag über Nacht beobachtet werden (Daten nicht dargestellt).

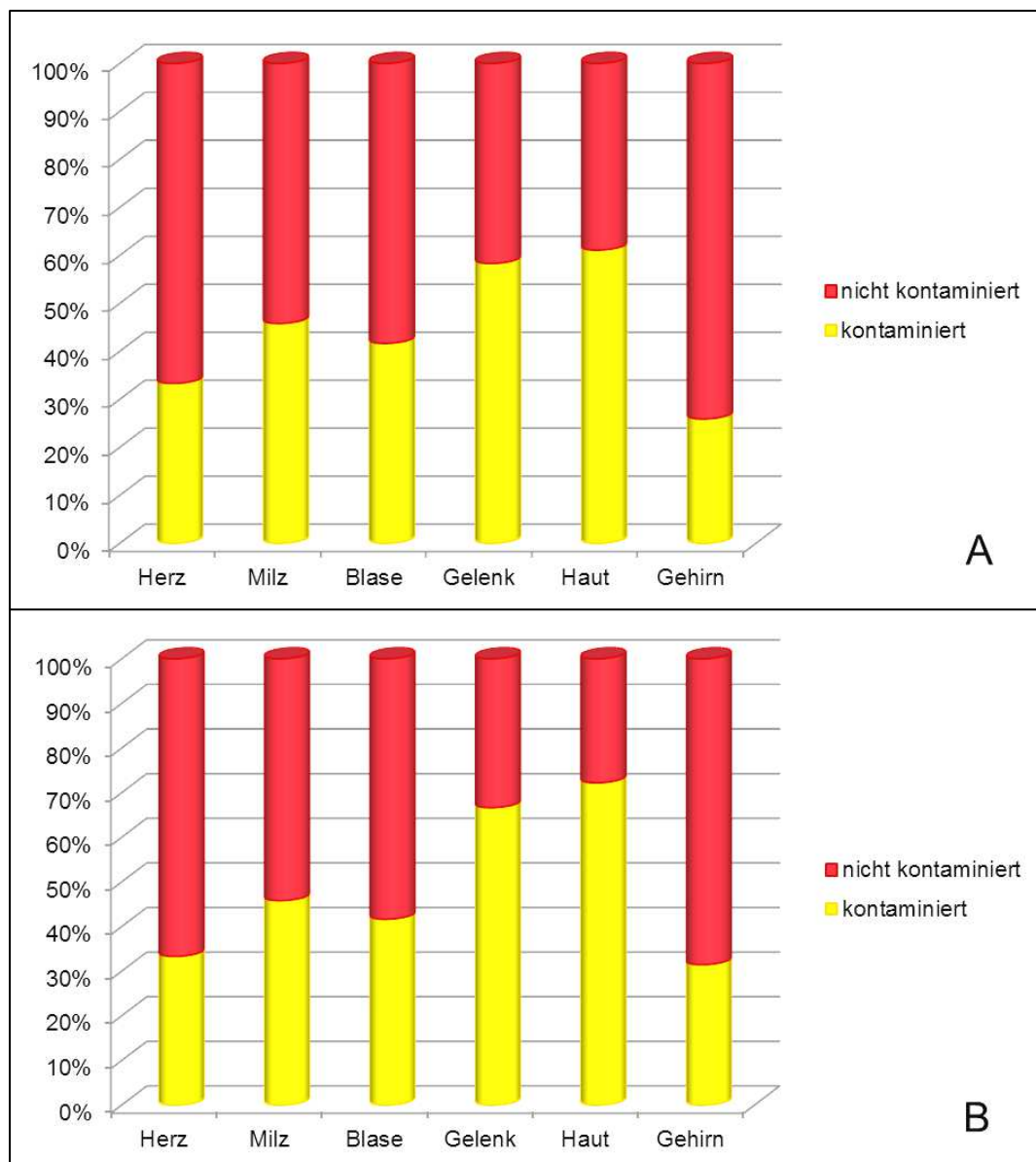


Abbildung 7: Anteil der kontaminierten und nicht kontaminierten Gewebekulturen

Prozentuale Verteilung des Auftretens von Kontaminationen pro Gewebeart nach ein- (A) bzw. zweiwöchiger (B) Inkubation. Nach drei Wochen zeigten sich keine neuen Kontaminationen (graphisch nicht dargestellt).

Das Auftreten von Kontaminationen während der Gewebekultivierung trotz einer sterilen Vorgehensweise wurde ebenso in anderen Studien beobachtet (KRUPKA et al., 2009; WANG et al., 2001, 2002). Auch wenn dadurch nicht in jedem Fall eine Kontamination verhindert werden kann (WANG et al., 2002), ist es möglich, dem Flüssignährmedium als kompensatorische Maßnahme ein Antibiotikum zu zusetzen. Dieser Einsatz könnte sich allerdings auf die Sensitivität auswirken, da Rückfallfieberborrelien sensibel gegen ein großes Spektrum von Antibiotika sind und Resistenzen bisher noch nicht beschrieben wurden (DWORKIN et al., 2008).

In den Originalrezepturen einiger bereits etablierter Kultivierungsmedien für *Borrelia*-Spezies wie BSK-II (BARBOUR, 1984) und BSK-H (POLLACK et al., 1993) ist ein Antibiotikum kein Bestandteil. In Studien, welche die Rekultivierung von anderen *Borrelia*-Spezies aus Organproben beabsichtigten, wurden beispielsweise Rifampicin (SINSKY et al., 1989; CADAVID et al., 2001; WANG et al., 2002) und Fosfomycin (SINSKY et al., 1989; CADAVID et al., 2001) als antibiotischer Zusatz dem Flüssignährmedium zugegeben. Weiterführende In-vitro-Versuche über die wachstumshemmende Wirkung dieser und anderer Antibiotika auf *B. persica* sollten angestrebt werden, damit zukünftig die Fremdkeimvermehrung durch Antibiotikazugabe reduziert oder verhindert werden kann. Denn eine Kontamination der Gewebekulturen kann ein positives Ergebnis und somit eine Aussage über die mögliche Dissemination der *Borrelia* in diese Organe verschleiern. Aus diesem Grund wurden die entnommenen Proben zweigeteilt und zusätzlich zur Kultivierung ein DNA-Nachweis mittels real-time PCR durchgeführt. Für die methodenvergleichende Auswertung der Ergebnisse der Organuntersuchungen wird auf Tabelle 1 der Publikation und entsprechende Passagen im Text des Ergebnis- und Diskussionsteils verwiesen.

Neben den Organproben wurden ebenso die Blutproben molekular mittels real-time PCR untersucht. Des Weiteren erfolgte eine serologische Kontrolle mit einem Zweistufentest (ELISA und Western Blot; siehe „Materials and Methods“ der Publikation). Aus Tierschutzgründen durfte nur eine geringe Blutmenge pro Tier und Tag entnommen werden. Somit ergab sich für die DNA-Extraktion eine Menge von 5 µl Vollblut. Aus dem gewonnenen Eluat wurden 2,5 µl DNA-Lösung in der real-time PCR eingesetzt. Die berechnete Nachweisgrenze der PCR lag bei rund 7,14 *Borrelia* im Reaktionsansatz. Es wäre nun möglich, dass eine Blutprobe als negativ gewertet wird, wenn sich zum Zeitpunkt der Entnahme nur wenige Spirochäten im Blut befinden und sich stark verteilen und somit die DNA-Konzentration im Reaktionsansatz unterhalb der Nachweisgrenze der PCR liegt. Im Experiment wurden bei 100 % der Mäuse, welche mit einer Dosis von 1×10^6 , 1×10^4 und 1×10^2 *B. persica* pro Maus infiziert wurden, ein bis drei DNA-Konzentrationspitzen (Peaks) in den seriell entnommenen Blutproben detektiert, wohingegen in den untersuchten Blutproben der Tiere, welche mit der niedrigsten Dosis von 4×10^0 *B. persica* pro Maus infiziert wurden, zu keiner Zeit *Borrelia*-DNA nachweisbar war. Auch wenn in der Literatur Infektionen erfolgreich durch

intraperitoneale Applikationen von nur einzelnen Borrelien etabliert wurden (SCHUHARDT et al., 1951; STOENNER et al., 1982), scheint in der hier beschriebenen Studie die geringe intradermal verabreichte Dosis von vier Borrelien nicht auszureichen, um auch nur bei einer der acht Mäuse eine systemische Infektion zu erzeugen und es ist davon auszugehen, dass die negativen Ergebnisse wahrscheinlich nicht aufgrund der Nachweisgrenze der PCR entstanden. Die Bestätigung dieses Sachverhaltes erfolgte in den anderen angewandten Testmethoden (ELISA, Western Blot, Gewebekultivierung; siehe „Results“ der Publikation), in denen ebenso keines dieser Tiere als infiziert galt. In der vorliegenden Arbeit wurden nicht nur die Tiere aus der 4×10^0 -Gruppe, sondern auch die negativen Kontrolltiere, welchen reines Flüssigmedium ohne Borrelien injiziert wurde, in keiner der Untersuchungsmethoden als positiv bewertet. Es lässt sich somit schlussfolgern, dass es zu keiner gegenseitigen Ansteckung innerhalb einer Käfigeinheit kam, da die Negativkontrolltiere auch mit stark positiven Tieren zusammen gehalten wurden. Bei den einzelnen Mäusen konnten keine Hautverletzungen, zum Beispiel aufgrund von Rankämpfen, festgestellt werden. Je niedriger die Infektionsdosis der Mäuse zu Beginn des Experiments war, umso später erschienen erste DNA-Signale in den mittels PCR untersuchten Blutproben der infizierten Tiere im Verlauf der Entnahmen. Mit einer dosisabhängigen zeitlichen Verschiebung ergaben sich hohe Spirochätenkonzentrationen in den ersten zweieinhalb Wochen p.i. (Dosis 1×10^6 : Tag 1 bis 12, Dosis 1×10^4 : Tag 2 bis 16, Dosis 1×10^2 : Tag 3 bis 17), welche dann von Tag 12 bis 17 stark abfielen. Ein Tier aus der 1×10^6 -Gruppe hatte am Tag 50 noch einmal nachweislich Spirochäten im Blut. Es traten in den verschiedenen Versuchsgruppen unterschiedliche „Rückfallmuster“ auf, welche durch die variierenden Konzentrationen der Borrelien im Blut hervorgerufen wurden (siehe Abbildung 1A–C der Publikation und entsprechende Passagen im Text des Ergebnisteils). Die wiederkehrenden Zyklen der Borrelien im Blutkreislauf von Mäusen wurden bereits in der Literatur beschrieben. Eine Studie mit *B. hermsii*, *B. duttonii* und *B. crocidurae* zeigte, dass während der ersten Woche nach subkutaner Injektion von 1×10^5 Borrelien eine hohe Konzentration der jeweiligen Spirochäten im Blut von immunkompetenten C57BL/6J-Mäusen auftrat und anschließend wiederholt schwächere Konzentrationsspitzen folgten, welche dann verschwanden. Im Fall von *B. hermsii* war die Infektion nach zwei bis drei Wochen selbstlimitierend. Nach einer starken Vermehrung (Median = 1×10^8 /ml) zu Beginn verursachte die Borrelie niedrigere und

klar abgetrennte Konzentrationsspitzen. *B. duttonii* und *B. crocidurae* zeigten ebenso am Anfang hohe Konzentrationen im Blut (Median = $7,3 \times 10^7$ /ml bzw. $3,7 \times 10^7$ /ml), allerdings verursachten die beiden Spezies häufigere Rückfall-episoden mit stärkeren Intensitäten als *B. hermsii* und die Konzentrationsspitzen waren nicht klar voneinander abgetrennt. Dagegen entwickelte *B. turicatae* eine sehr milde Spirochätämie für zwei bis drei Tage in nur der Hälfte der inokulierten Tiere (LARSSON et al., 2006). In der Studie von Yokota et al. erschienen nach intraperitonealer Injektion von 1×10^2 *B. duttonii*-Spirochäten diese nach zwei bis drei Tagen im Blut. Starke Spirochätämien wurden am Tag 5 bis 8 erfasst. Zu dieser Zeit starben über die Hälfte der BALB/c-Mäuse und die Überlebenden eliminierten, nach erneutem Auftreten von ein bis zwei niedrigen Konzentrationspitzen, die Infektion aus ihrem Blut (YOKOTA et al., 1997). Babudieri beschrieb, dass sich die Präsenz der Spirochäten (aus Jordanien) im Mäuseblut sehr variabel gestaltete (BABUDIERI, 1957). Selbst wenn mehrere Meerschweinchen mit der gleichen Blutprobe eines Patienten infiziert wurden, war der Krankheitsverlauf dieser Tiere nicht einheitlich (ASHBEL, 1949). Ebenso wurden in der vorliegenden Forschungsarbeit bei den einzelnen Tieren unterschiedliche Konzentrationsmuster von Borrelien-DNA detektiert (siehe Abbildung 2A–C der Publikation). Das dosisabhängige Erscheinen erster Borrelien in der Zirkulation und die variierende Kinetik der *B. persica*-Infektion sollten berücksichtigt werden, wenn aufbauend auf diesem etablierten Tiermodell Folgeexperimente geplant werden. Für Versuche, welche beispielsweise die Borrelienübertragung von Tier zu Tier via Blut oder die Rekultivierung der Spirochäten aus dem Blut beinhalten, sollten wiederholt Blutproben an aufeinanderfolgenden Tagen während der ersten zwei Wochen p.i. unter Berücksichtigung des theoretischen Erscheinungszeitpunktes genommen werden, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, hohe Spirochätenkonzentrationen zu erhalten. Die tatsächliche Borrelienanzahl in der Probe könnte dann mittels PCR oder durch Auszählung mit Hilfe eines Dunkelfeldmikroskops bestimmt werden. In der vorliegenden Arbeit lag das Konzentrationsmaximum einer individuellen Spirochätämie bei $2,3 \times 10^7$ *B. persica*/ml am Tag 5. Das Tier stammte aus der Gruppe, welche mit einer Dosis von 1×10^4 *B. persica* pro Maus infiziert wurde. Die Maximalkonzentrationen in den Mäusen waren ca. dreimal so hoch wie die, welche *B. persica* in Meerschweinchen erzielte ($6,8 \times 10^6$ /ml am Tag 4 p.i. (NADDAF et al., 2011)). In Forschungsarbeiten, in denen Mäuse verwendet wurden, lagen die individuellen Maxima der Tiere nach

Infektion mit *B. hermsii* ($1,5 \times 10^8/\text{ml}$), *B. duttonii* ($1,1 \times 10^8/\text{ml}$) und *B. crocidurae* ($8,5 \times 10^7/\text{ml}$) allerdings deutlich höher (LARSSON et al., 2006). In Studien aus der Literatur schwankten die Konzentrationen der Inokula zwischen 10^2 (YOKOTA et al., 1997) und 10^7 (NORDSTRAND et al., 2001) Spirochäten pro Maus. Sogar einzelne Borrelien wurden erfolgreich injiziert (SCHUHARDT et al., 1951; STOENNER et al., 1982). Dabei wurden die Bakterien vor allem intraperitoneal (SCHUHARDT et al., 1951; STOENNER et al., 1982; YOKOTA et al., 1997; ASSOUS et al., 2006), subkutan (NORDSTRAND et al., 2001; LARSSON et al., 2006, 2009) oder intradermal (GARCIA-MONCO et al., 1997) inokuliert. Ob sich eine Infektion erfolgreich etabliert, kann nicht nur von der Konzentration des Inokulums abhängen, sondern kann auch von genetischen Komponenten des Erregers und des Wirtstieres bestimmt werden (WANG et al., 2001; PENNINGTON et al., 1997; BENOIT et al., 2010). Beispielsweise in einer Studie mit *B. turicatae* schien Serotyp A nur schwach infektiös für C57BL/6J-Mäuse zu sein, da die Hälfte der inokulierten Tiere keine Spirochätämie entwickelte (LARSSON et al., 2006). Dieser Serotyp zeigte ebenso in immundefizienten Mäusen eine achtmal niedrigere Konzentration im Blut als Serotyp B. Des Weiteren unterschieden sich die beiden Varianten in der Stärke der Ausbildung von Gelenksentzündungen (PENNINGTON et al., 1997). Bei der Analyse der *flaB*-Sequenzen von Isolaten aus israelischen TBRF-Patienten und Zecken ergaben sich drei genetisch unterschiedliche Subtypen für *B. persica* (ASSOUS et al., 2006). Auch bei den Sequenzanalysen anderer Gene von *B. persica*-Isolaten wurden unterschiedliche Genovare gefunden (SAFDIE et al., 2010). Inwieweit sich diese in Infektiosität und Pathogenität für einen Wirt unterscheiden, wurde nicht untersucht. Neben dem Erreger selbst hat auch der Wirt einen Einfluss auf den Infektionsverlauf. Rodhain fasste in seinem Review die experimentelle Pathogenität von *B. persica* für verschiedene Tierarten zusammen. Die Spirochäten sind für Meerschweinchen, Igel und Hasen sehr pathogen, wohingegen die Pathogenität für Affen, adulte Mäuse und Ratten geringer ausfällt (RODHAIN, 1976). Es wird beschrieben, dass sogar verschiedene Mausstämme genetisch unterschiedlich empfindlich für eine Borrelieninfektion sind und selbst das Geschlecht des Tieres einen Einfluss auf den Infektionsverlauf zu haben scheint (BENOIT et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit wurden weibliche immunkompetente C3H/HeOuJ-Mäuse verwendet. Diese Tiere wurden zuerst mit einer hohen Dosis infiziert und anschließend wurde die Dosis, in Hinblick auf die

Ermittlung der minimal infektiösen Konzentration von *B. persica* Stamm LMU-C01, reduziert. Nach den Erkenntnissen der Studie liegt diese zwischen vier und 100 Borrelien pro Maus.

Als eine sichere Methode die *B. persica*-Infektion einer Maus nach einer gewissen Zeit zu bestätigen, galt in dieser Studie der Nachweis einer Immunantwort des Tieres mit Hilfe eines serologischen Zweistufentests. Niedrige Antikörperkonzentrationen waren bereits ab dem ersten Tag p.i. im ELISA erfassbar, stiegen dann steil bis Tag 21 an und bildeten ein Plateau bis Tag 50 (siehe Abbildung 3A der Publikation). Eine Aussage über die Immunantwort der Maus in Hinblick auf eine etablierte oder nicht etablierte Infektion des Erregers lässt sich aufgrund der benötigten Serummenge der Einfachheit halber am Tag der Euthanasie bestimmen. Dafür wird das Serum mittels ELISA voruntersucht und so die Höhe des Antikörperspiegels ermittelt. Anschließend wird mit einem Western Blot das Bandenmuster der Probe mit denen einer positiven und negativen Kontrolle verglichen und somit die Infektion bestätigt oder ausgeschlossen (siehe Material- und Methodenteil der Publikation). Die serologischen Untersuchungsmethoden dieser Studie differenzierten dabei nicht zwischen dem Auftreten von IgM- und IgG-Antikörpern. Im Experiment zeigten auch die Tiere, welche mit niedrigeren Dosen von 1×10^2 und 1×10^4 Borrelien pro Maus infiziert wurden, am Tag ihrer Euthanasie (Tag 30–32) hohe Antikörperkonzentrationen und ähnliche Bandenmorphologien wie auch die Tiere aus der 1×10^6 -Gruppe. Dass die negativen Tiere bzw. die Tiere, welche mit 4×10^0 Borrelien pro Maus infiziert wurden, am Tag der Euthanasie mediane Titer von 11,2 bzw. 5,4 KELA-Einheiten im ELISA erzielten, lag vermutlich an unspezifischen Reaktionen kreuzreagierender Antikörper. Das ließ sich im Western Blot bestätigen, da dieser nicht das typische Bandenmuster zeigte (siehe Abbildung 3B–C der Publikation). Eine Analyse bzw. Identifizierung der einzelnen reagierenden Proteinbanden wurde in dieser Forschungsarbeit nicht durchgeführt. Die unspezifischen Banden von 25 und 37 kDa waren auch auf den Streifen erkennbar, welche mit den gepoolten Plasmaproben, gesammelt am ersten Tag nach Start des Experiments von den negativen Mäusen und den Tieren aus der 1×10^6 -Gruppe, inkubiert wurden (Daten nicht dargestellt). Somit ist es unwahrscheinlich, dass diese Banden spezifische Antikörperreaktionen auf die Infektion repräsentierten. Auch in anderen Studien wurden IgM-Antikörper in nicht infizierten Mäusen detektiert (BOLZ et al., 2006).

Des Weiteren erkannten Martin et al., dass sich B-Zellen innerhalb der ersten drei Tage nach Stimulation mit bakteriellen Antigenen (Lipopolysaccharide) zu IgM-produzierenden Plasmablasten differenzieren (MARTIN et al., 2001). Belperron et al. detektierten ebenso ab dem dritten Tag *B. hermsii*-spezifische IgM-Antikörper im Mausserum (BELPERRON et al., 2005). Die Ergebnisse aus einer Studie, bei der 1×10^2 *B. duttonii* intraperitoneal in BALB/c-Mäuse inokuliert wurden, offenbarten messbare IgM-Antikörper nach vier bis sechs Tagen im ELISA. Die Konzentrationen erreichten von Tag 8 bis 10 ihre Maximalwerte und sanken dann allmählich ab. Eine IgG-Antikörperproduktion erfolgte ab Tag 7 (YOKOTA et al., 1997). Serumantikörper gegen die rekombinante GlpQ von *B. recurrentis* persistieren bei einem Patienten nach zweimaliger Infektion mit dem Läuse Rückfallfieber im Abstand von zwei Monaten über einen Zeitraum von 27 Jahre (PORCELLA et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden Antikörper gegen *B. persica* in der Maus bis zum Tag 50 p.i. detektiert. Wenn Langzeitstudien geplant sind, sollten serologische Untersuchungen in regelmäßigen Abständen fortgeführt werden, um den Abfall des Antikörperspiegels oder auch persistierende Titer, welche durch das erneute Auftreten der Spirochäten im Blut nach Organdissemination entstehen könnten, nachzuweisen.

Denn einige Autoren berichteten von einem Tropismus der Rückfallfieberborrelien zum Gehirn. Babudieri beschrieb das Überleben von Spirochäten aus Jordanien in Mausgehirnen nach experimenteller Infektion (BABUDIERI, 1957). Die Gehirne von Ratten blieben 20 Monate länger mit *Spirochaeta persica*-Stämmen aus Palästina infiziert als ihr Blut. Bei Meerschweinchen war das zum Teil noch nach über einen Jahr der Fall (ASHBEL, 1942, 1949). Andere Rückfallfieberborrelien wie *B. crocidurae* und *B. duttonii* infiltrierten ebenso Gehirne und blieben über eine gewisse Zeit, nachdem sie aus der Blutzirkulation verschwunden waren, infektiös für gesunde Mäuse (LARSSON et al., 2006). Dabei konnte eine Invasion des Gehirns mit *B. crocidurae* bereits nach zwei Tagen p.i. festgestellt werden (NORDSTRAND et al., 2001). Cadavid et al. beschrieben, dass der Tropismus zum Gehirn von *B. turicatae* sogar bei zwei Serotypen, welche auf Grundlage ihrer oberflächlichen variablen Lipoproteine (VspA, VspB) definiert sind, unterschiedlich ausgeprägt ist. Die Anzahl der Spirochäten vom neurotrophen Serotyp A in den Leptomeningen von Mäusen war am Tag 18 p.i. signifikant höher als die Zahl von Serotyp B, welche signifikant höher in Hautproben war

(CADAVID et al., 2001). In der vorliegenden Forschungsarbeit wurden wiederholt *B. persica*-Spirochäten sowohl durch Kultivierung also auch mit der PCR in den Gewebeproben des Gehirns und der Haut nachgewiesen (siehe Tabelle 1 der Publikation). In der Literatur wurde beispielsweise *B. hermsii* in der Milz, Leber und im Herzen detektiert (BENOIT et al., 2010). Auch spanische Rückfallfieberborrelien (Isolat einer unbekannten Spezies) wurden in einer Studie von Anda et al. in der Milz und der Leber gefunden. Die C3H/HeN-Mäuse hatten eine ausgeprägte Splenomegalie und eine reaktive Hepatitis (ANDA et al., 1996). In der Studie von Cadavid et al. waren am Tag 18 und 40 nach erfolgter *B. turicatae*-Infektion minimale bzw. starke entzündliche Reaktionen in den HE-gefärbten Schnitten der Meningen des Gehirns bzw. der Haut von immundefizienten Mäusen mikroskopisch auffindbar. Bei den Zellinfiltraten der Haut handelte es sich hauptsächlich um Makrophagen. Es wurden keine Entzündungen oder Spirochäten im Hirnstamm und Kleinhirn gefunden (CADAVID et al., 2001). Nach 24 Tagen p.i. waren bei den C3H/HeN-Mäusen, welche mit spanischen Rückfallfieberborrelien infiziert wurden, Meningoenzephalitiden erkennbar. Bei den Zellinfiltraten handelte es sich überwiegend um Plasmazellen, B-Lymphozyten und Monozyten (GARCIA-MONCO et al., 1997). In den Mäusegehirnen, welche mit *B. crocidurae* infiziert waren, wurden neben Lymphozyten und Monozyten auch Granulozyten sowie Makrophagen detektiert (NORDSTRAND et al., 2001). Im Gegensatz dazu blieben die histopathologischen Untersuchungen des Gehirns in Hinblick auf entzündliche Veränderungen in der vorliegenden Forschungsarbeit ergebnislos. Die Haut wurde nicht beurteilt. Diese zuerst unerwarteten Resultate reflektieren das unveränderte Allgemeinbefinden und Verhalten der infizierten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren. Allerdings hatten auch die immunkompetenten C3H/HeN-Mäuse trotz Meningoenzephalitiden nach Infektion mit einem spanischen Rückfallfieberisolat keine offensichtlichen Anzeichen einer physischen Erkrankung (GARCIA-MONCO et al., 1997). Dieses Isolat verursachte selbst bei B-zelldefizienten Mäusen trotz erheblicher Spirochätämie von rund 4×10^8 Borrelien/ml über vier bis fünf Tage keine offensichtlichen negativen Auswirkungen (CONNOLLY et al., 2001). Nur vier von 30 Mäusen zeigten nach einer *B. crocidurae*-Infektion neurologische Symptome ab Tag 8, welche sich durch die Unfähigkeit von koordinierten Bewegungen beim Anheben und/oder im Schwimmtest bemerkbar machten (NORDSTRAND et al., 2001). Des Weiteren trat eine periphere vestibuläre Störung bei CB-17-*scid*-Mäusen nach einer

B. turicatae-Infektion auf (CADAVID et al., 2001) und Zamani et al. beschrieben in ihrer Veröffentlichung, dass *B. microti* Fieber in Mäusen verursacht (ZAMANI et al., 2014). Auch in der Studie von Benoit et al. wurde deutlich, dass bei immundefizienten Mäusen (BALB/c *rag2*^{-/-} und C3H/HeN *rag2*^{-/-}) mit steigender Konzentration von *B. hermsii* im Blut zunehmende klinische Symptome wie Apathie und struppiges Fell auftraten (BENOIT et al., 2010). Selbst immun-kompetente BALB/c-Mäuse können aufgrund einer starken Vermehrung von *B. duttonii* versterben (YOKOTA et al., 1997).

Die C3H/HeOuJ-Mäuse aus der vorliegenden Arbeit zeigten jedoch keine klinischen Symptome, was täglich anhand eines Score-Sheets (siehe Abbildung A1 im Anhang) evaluiert wurde. Keines der Tiere musste aufgrund der Kriterien frühzeitig aus der Studie ausgeschlossen werden. Somit ist dieses Tiermodell unter Berücksichtigung der Vermeidung von Schmerzen, Leiden und Schäden vertretbar. Aufgrund des Forschungsinteresses ist es von entscheidender Bedeutung In-vivo-Experimente durchzuführen, da gerade die komplexen Abwehrreaktionen des Körpers in Verbindung mit der genetischen Variabilität des Pathogenes momentan nicht detailliert in vitro nachgestellt werden können. Die Verwendung von Mäusen statt Meerschweinchen sollte bevorzugt werden, da ihre Haltungsbedingungen, Lebenserwartung und Reaktion auf die *B. persica*-Infektion im Vergleich vorteilhafter und ethisch vertretbarer sind. Meerschweinchen, welche vor allem im Mittleren Osten überwiegend verwendet werden (NADDAF et al., 2011; OSHAGHI et al., 2011; RAFINEJAD et al., 2011; ZAMANI et al., 2014), reagieren mit Fieber auf eine *B. persica*-Infektion (ZAMANI et al., 2014), was vermutlich zu einem schlechten Allgemeinbefinden und somit zum Leiden der Tiere führt. Außerdem ließen sich *B. persica*-Experimente, welche mit Mäusen durchgeführt werden, mit den Studien von anderen Rückfallfieberspezies vergleichen, da sich das Mausmodell als ein weitverbreitetes und akzeptiertes Tiermodell in der Erforschung dieser Bakteriengruppe erweist (GARCIA-MONCO et al., 1997; NORDSTRAND et al., 2001; LARSSON et al., 2006, 2009).

2 Potentielle Reservoir für *B. persica*

Als natürlich vorkommende Wirte für *Ornithodoros*-Zecken werden verschiedene Arten von Hörnchen und Mäusen vermutet. Für die Verbreitung von Zecken in entferntere Regionen könnten Fledermäuse und Vögel von Bedeutung sein. Auch werden Begleittiere, Nutztiere und der Mensch selbst befallen. Dabei variiert das

Wirtsspektrum zwischen den einzelnen Zeckenarten (CUTLER, 2010) (siehe Tabelle 1 im Kapitel II.2.2). *O. tholozani* befällt jeden Warmblütler, der sich in ihrem Habitat befindet. Hauptsächlich ernährt sie sich vom Blut von Nagetieren und anderen Kleinsäugetern (ASSOUS et al., 2009). Dennoch ist nur wenig über die Identität ihrer Hauptnagetierwirte bekannt (MOEMENBELLAH-FARD et al., 2009). Abgesehen davon wurde die Zecke in Schafställen (RAFINEJAD et al., 2012) sowie auf Kamelen und Rindern gefunden (DSCHUNKOWSKY, 1913). Innerhalb der Zeckenpopulation wird *B. persica* sowohl transstadial als auch transovariell übertragen. Wenn die Transmission von Bakterien auf beide Weisen erfolgt, handelt es sich bei den Zecken ebenfalls um ein Reservoir für diese Bakterien (PAROLA et al., 2001). Dafür spricht außerdem die generelle Langlebigkeit von Lederzecken (CUTLER, 2010).

Auch die meisten Spezies der Rückfallfieberborrelien können mehrere Arten von Wirtstieren infizieren (CUTLER, 2010). Normalerweise dienen wilde Nagetiere als Reservoirwirte (REBAUDET et al., 2006; PAROLA et al., 2001). In Israel wurden noch keine mit Borrelien infizierten Nager gefunden (ASSOUS et al., 2009). Jedoch wurde *B. persica* in einem Hund, einer Katze und einem Krallenaffen nachgewiesen (BANETH et al., 2004). Auch im Iran muss die Wirbeltierart, welche als natürliches Reservoir für diese Spezies dient, noch aufgeklärt werden (SHIRANI et al., 2016). Allerdings wurde dort *B. persica* bereits aus dem Blut eines Nagetiers isoliert (COLIN DE VERDIÈRE et al., 2011). Leider sind keine näheren Informationen sowohl über die Nagetierspezies als auch über das klinische Befinden des Tieres bekannt. Des Weiteren wurde *B. persica*-DNA aus dem Blut von Hunden, Schafen und Ziegen nachgewiesen (SHIRANI et al., 2016). Im Iran existiert eine üppige Fauna von Hunden und kleinen Wildtieren, wie Nagetiere. Es ist anzunehmen, dass sich *B. persica* in enzootischen Zyklen hält, in denen sowohl wilde als auch domestizierte Säugetiere als Wirte fungieren (BARMAKI et al., 2010). Umfangreiche Studien sollten in den betroffenen Ländern angestrebt werden, welche die potentiell vorhandene *B. persica*-Infektion zum einen in verschiedenen Nagetierspezies und zum anderen in Zecken, gesammelt aus Nagetiernestern, untersuchen, um das natürlich vorkommende Reservoirwirbeltier zu identifizieren.

Bei anderen Spezies von Rückfallfieberborrelien lassen sich als mögliche Reservoirtiere ebenso Nager aufzählen. *B. microti* wurde zum Beispiel ursprüng-

lich aus Feldmäusen (*Microtus*) im südlichen Iran isoliert (RAFYI, 1947; NADDAF et al., 2012) und bei untersuchten TBRF-Fällen aus dem Nordwesten der USA und dem Südwesten von Kanada wurden am Expositionsort Hörnchen, Mäuse und/oder Ratten gesehen (DWORKIN et al., 1998).

In der vorliegenden Forschungsarbeit kam ein immunkompetenter Mausstamm (*Mus musculus*, C3H/HeOuJ, Abbildung 8) zum Einsatz.



Abbildung 8: weibliche, ca. 12 Wochen alte C3H/HeOuJ-Maus

Da die Mäuse über die Dauer des Experiments keine klinischen Symptome entwickelten, könnte die Maus als mögliches Reservoirtier für *B. persica* in Frage kommen. Denn generell ist es wahrscheinlich, dass eine Infektion von natürlichen Reservoirtieren gutartig verläuft (CUTLER, 2010). Der Beweis einer tatsächlich bestehenden Infektion der Tiere konnte durch die Rekultivierung lebensfähiger Erreger aus den Gewebeproben erbracht werden (siehe Tabelle 1 der Publikation). Ein weiterer stützender Punkt dieser These ist, dass bei den Mäusen, welche mit Dosen von 1×10^6 bis 1×10^2 Borrelien infiziert wurden, mehrere Bakteriämieschübe mittels Blut-PCR detektiert werden konnten (siehe Abbildung 1A–C der Publikation). Die bei einer aktiven Infektion wiederkehrenden hohen Erregerkonzentrationen im Blut würden die Borrelien somit häufiger für einen Vektor zugänglich machen. Je länger die Borrelien in der Zirkulation überleben, umso höher ist die Wahrscheinlichkeit für den Erreger von einer Zecke bei ihrem nur kurz andauernden Saugakt aufgenommen zu werden (SCHWAN et al., 2002;

PLASTERK et al., 1985). Ein Tier hatte selbst am letzten Tag des Experiments (Tag 50) eine messbare Anzahl an Borrelien im Blut. Um die These zu festigen, sollte in einer Folgearbeit überprüft werden, ob sich eine systemische Infektion in der C3H/HeOuJ-Maus nach dem Stich einer infizierten Zecke etablieren lässt. Ein solches Experiment wurde in einer Studie von Geigy et al. durchgeführt, um mögliche Reserviertiere von *B. duttonii* zu ermitteln. Dabei wurden wild lebende Ratten als natürliches Reservoir für unwahrscheinlich erklärt, da sie sich nicht per Zeckenstich infizierten (GEIGY et al., 1957).

Welche Arten der Mäuseverwandten (Myomorpha) in den einzelnen betroffenen Ländern als natürlich vorkommende Reservoir für *B. persica* dienen könnten, sollte in künftigen epidemiologischen Studien ermittelt werden. Dabei könnten Untersuchungen von Wildfängen aus TBRF-Regionen entscheidende Informationen liefern.

3 Nutzen und Ausblick

Neben der In-vitro-Kultivierung sind auch In-vivo-Modelle von großer Bedeutung für die Erforschung von Infektionserregern (SAFDIE et al., 2010; VAN DAM et al., 1999; LARSSON et al., 2009). Da momentan nach bestem Wissen noch kein detailliert beschriebenes Mausmodell für *B. persica* existiert, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Infektionsmodell in der immunkompetenten Maus etabliert und charakterisiert. Die Ergebnisse aus den Untersuchungen am murinen Infektionsmodell lassen sich aufgrund speziesspezifischer Variationen nicht direkt auf den Menschen übertragen (VUYYURU et al., 2011). Sie sollten viel mehr als hinweisgebend für eventuell vorliegende Parallelen angesehen werden sowie Wissen über den Infektionsverlauf vermitteln und eine grundlegende Basis für Folgeexperimente bieten. Wichtige Gemeinsamkeit der Infektionsverläufe von Mensch und Maus sind die wiederkehrenden Episoden der Spirochätämie, wohingegen das Auftreten klinischer Symptome unterschiedlich ausgeprägt ist. Um eine bessere Vergleichbarkeit der physiologischen Bedingungen bei einer Infektion zu ermöglichen, könnten weiterführende Versuche an einer mit dem Menschen enger verwandten Spezies durchgeführt werden. Aber ein Mausmodell bietet dennoch die Möglichkeit grundlegende Thematiken, wie zum Beispiel die Identifizierung von Pathogenitätsfaktoren des Erregers in vivo, die Erreger-Wirt-Interaktion oder die Immunreaktion des Wirtes, zu erforschen.

In Folgearbeiten könnten Langzeitstudien durchgeführt werden, die den späteren Verlauf einer *B. persica*-Infektion weiterführend charakterisieren. Dafür sollte der Versuch mehr als 50 Tage fortgeführt werden, um zu untersuchen, wie lange Borrelien im Blut nachweisbar sind und ab welchem Zeitpunkt diese endgültig nicht mehr erfasst werden können. Dabei könnte analysiert werden, inwieweit die Dissemination in die Gewebe (Gehirn, Haut) eine Rolle für später auftretende Bakteriämieschübe spielt. Es könnte zusätzlich untersucht werden, wie lange die disseminierten Spirochäten aus dem Gehirn für gesunde Mäuse infektiös sind und ob sich eine latente Infektion nach Immunsuppression reaktivieren lässt. Das wäre für die erneute Zugänglichkeit der Borrelien für einen Vektor relevant und würde das Gehirn selbst zum Reservoir machen (LARSSON et al., 2006). Der Sachverhalt wurde bereits für *B. duttonii* beschrieben. Die Spirochäten konnten nach Schwächung des Immunsystems bei drei von 11 Mäusen erneut im Blut nachgewiesen werden (LARSSON et al., 2006). Diese Reaktivierung aufgrund einer Immunsuppression könnte ebenso für den Menschen bedeutend sein, welcher als geheilt gilt, wenn nach dem letzten Fieberschub Symptomfreiheit besteht und keine Spirochäten mehr im Blut nachweisbar sind (LARSSON et al., 2006). Aufklärungsbedarf besteht bei den Ergebnissen aus den histopathologischen Untersuchungen der vorliegenden Studie (siehe „Results“ der Publikation). Aufgrund der geringen Zahl der verwendeten Gewebe sollte dieser experimentelle Teil mit einer größeren, repräsentativen Anzahl an Organproben wiederholt werden, um die Ergebnisse zu verifizieren oder zu widerlegen. Auch könnten die Organe zu einem früheren Zeitpunkt nach dem Setzen der Infektion untersucht werden, um beginnende Entzündungsreaktionen aufzudecken.

Praxisrelevantere Fortführung dieser Arbeit könnte die Anwendung der hier etablierten Methoden sein, um potentielle Reserviertiere aus den TBRF-Gebieten zu identifizieren. In der humanmedizinischen Diagnostik kann die Detektierbarkeit der Borrelien im Blutausschrieb problematisch sein, wenn die Probe des Patienten während einer fieberfreien Phase untersucht wird oder es sich um eine milde Infektion handelt (NADDAF et al., 2011; RAFINEJAD et al., 2012). B-Zellen differenzieren sich innerhalb der ersten drei Tage nach Stimulation zu IgM-produzierenden Plasmablasten (MARTIN et al., 2001). Trotzdem ist momentan noch kein spezifischer serologischer Test für *B. persica* verfügbar (ASSOUS et al., 2009). In der vorliegenden Forschungsarbeit konnten 100 % der infizierten Mäuse mit einem Zweistufentest (ELISA und Western Blot) identifiziert werden.

Das hier etablierte Nachweisverfahren könnte ausgebaut werden, um sicherere Diagnosen zu stellen. Dabei sollten bei der Entwicklung mögliche kreuz-reagierende Antikörper berücksichtigt und die Sensitivität sowie vor allem die Spezifität im Feld kritisch erprobt werden. Eine andere Möglichkeit weiterführend am Infektionsmodell zu forschen, wäre die Testung von verschiedenen Antibiotika zu therapeutischen und prophylaktischen Zwecken.

Diese weiterführenden Arbeiten könnten zukünftig an Relevanz gewinnen und die Erforschung des Infektionserregers zunehmend Bedeutung erlangen, denn nicht nur Reisende (COLIN DE VERDIÈRE et al., 2011), sondern auch Menschenbewegungen aus politischen Gründen (Flüchtlinge) könnten vermehrt *B. persica*-Infektionen nach Europa einschleppen. Deshalb handelt es sich bei der TBRF-Erkrankung um eine „emerging disease“ (REBAUDET et al., 2006).

In einigen Ländern wie der Schweiz (GOLDENBERGER et al., 2015), den Niederlanden (WILTING et al., 2015) und Deutschland (HOCH et al., 2015) wurden bereits *B. recurrentis*-Infektionen in Flüchtlingen nachgewiesen. Auch können sich die Menschen in Ländern entlang ihrer Migrationsroute infizieren (HOCH et al., 2015). Im Jahr 2015 wurden rund 1,1 Millionen neu ankommende Asylsuchende in Deutschland registriert, davon wurden rund 160.000 auf Bayern verteilt. Von Januar bis März 2016 waren es noch 24.000 Menschen. Bei den Asylbeantragungen, welche in diesem Zeitraum durch das Bundesamt für Migration und Flüchtlinge in Bayern bearbeitet wurden, handelte es sich überwiegend um aus Syrien stammende Personen (BAYERISCHES STAATSMINISTERIUM FÜR ARBEIT UND SOZIALES, 2016). Die *B. persica*-übertragende *O. tholozani*-Zecke ist in diesem Land heimisch (PAROLA et al., 2001). Allerdings verlässt *Ornithodoros* ihr Habitat nicht (ASSOUS et al., 2009) und so ist es möglich, dass nur die Erkrankten (KUTSUNA et al., 2013; COLIN DE VERDIÈRE et al., 2011) und nicht der Vektor selbst in nicht endemische Länder gelangen. Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass sich TBRF, verursacht durch *B. persica*, in Deutschland ausbreitet, wie es beispielsweise bei dem Läuserückfallfieber möglich wäre, da die Läuse an ihren Wirten verbleiben. Dieses Rückfallfieber besitzt epidemisches Potential (CUTLER, 2006; WILTING et al., 2015).

Trotzdem sollten sich Ärzte der potentiellen Gefahr auch hier in Deutschland bewusst werden, damit TBRF als mögliche Differenzialdiagnose einer fieberigen

Erkrankung berücksichtigt und folglich schneller behandelt werden kann. Auch in den endemischen Ländern sollte das Bewusstsein geschärft werden. Obwohl TBRF im Iran meldepflichtig ist, besitzt die Erkrankung im Allgemeinen keine hohe Priorität bei den Gesundheitsbehörden. Die tatsächliche Last sowie präzise geographische Verbreitung bleibt unbekannt und es könnten wahrscheinlich viele Fälle fehldiagnostiziert oder nicht erkannt worden sein (MOEMENBELLAHFARD et al., 2009). Es ist beispielsweise erforderlich, das Gesundheitswesen über die Existenz *B. persica*-positiver Zecken in den früher von TBRF betroffenen Gebieten Takistans zu unterrichten und Vektorkontrollmaßnahmen fortzuführen (BARMAKI et al., 2010), damit die Zoonose bereits in den Herkunftsländern bekämpft und die Gefahr einer Infektion für Einheimische und Touristen niedrig gehalten werden kann.

V ZUSAMMENFASSUNG

Die Spezies *B. persica* zählt zu den Infektionserregern, welche TBRF verursachen, und wird von der Lederzecke *O. tholozani* während des Saugaktes übertragen. Dieser Vektor ist im Mittleren Osten und Zentralasien weit verbreitet. Das von Zecken übertragene Rückfallfieber stellt eine erhebliche gesundheitliche Gefährdung für die betroffene Bevölkerung und auch für Touristen dar. Die Infizierten leiden an wiederkehrendem Fieber, welches mit unspezifischen Symptomen wie Kopfschmerzen und Schüttelfrost einhergehen kann. Zwischen den Fieberschüben sind beschwerdefreie Phasen zu verzeichnen. Das Leitsymptom „rekurrentes Fieber“ sowie ein massives Auftreten von Spirochäten im Blut während einer Fieberattacke charakterisieren die TBRF-Erkrankung. Nach Diagnosestellung sollte frühzeitig mit der antibiotischen Therapie begonnen und auf das potentielle Auftreten einer Jarisch-Herxheimer-Reaktion geachtet werden. Generell kann nicht nur der Mensch, sondern auch das Tier an einer Infektion mit *B. persica* erkranken.

Für die Erforschung von Krankheitserregern sind neben der In-vitro-Kultivierung auch In-vivo-Experimente von herausragender Bedeutung. Um Einblicke in die Entstehung und den Verlauf dieser Infektion zu erlangen, wurden 44 immunkompetente C3H/HeOuJ-Mäuse mit variierenden Konzentrationen einer *B. persica*-Suspension intradermal infiziert und über mindestens 30 bis maximal 50 Tage beobachtet. Im gesamten Verlauf des Experiments zeigte keines der infizierten Tiere einen abweichenden Gesundheitszustand oder untypisches Verhalten im Vergleich zu den Kontrolltieren, welche in allen Untersuchungsmethoden negativ getestet wurden. In dieser Studie reagierten 100 % der Tiere, welche mit einer Dosis von 1×10^6 , 1×10^4 und 1×10^2 *B. persica* pro Maus inokuliert wurden, in den Tests positiv auf den Erreger, wohingegen die am stärksten verdünnte Konzentration von 4×10^0 *B. persica* pro Maus nicht ausreichte, um auch nur eines der acht Tiere zu infizieren. Blutproben wurden seriell nach alternierenden Zeitplänen entnommen und mit einer real-time PCR, welche das *flaB*-Gen von *B. persica* detektiert, untersucht. Die molekulare Analyse erfasste ein bis drei DNA-Konzentrationspitzen pro infizierte Maus. Außerdem war eine zeitliche Verschiebung im Auftreten erster Bakterien im Blut sowie der Spitzenwerte der medianen Konzentrationen mit sinkender Infektionsdosis zwischen den einzelnen

Versuchsgruppen zu verzeichnen. Starke Antikörpertiter gegen *B. persica* konnten bei allen drei infizierten Gruppen mit einem Zweistufentest, bestehend aus einem ELISA und einem Western Blot, nachgewiesen werden. Am Versuchsende wurden Organe (Herz, Milz, Harnblase, Tarsalgelenk, Gehirn und Haut von der Injektionsstelle) entnommen und mit der *flaB*-PCR auf *B. persica*-spezifische DNA sowie per Kultivierung im selbstentwickelten Flüssignährmedium auf lebensfähige Erreger untersucht. Das Ergebnis der Gewebeanalysen identifiziert das Gehirn und die Haut als Zielorgane einer *B. persica*-Infektion.

Die Etablierung eines Infektionsmodells für *B. persica* in immunkompetenten Mäusen stellt eine grundlegende Basis für die In-vivo-Forschung dar und ermöglicht es weitere tief greifende Sachverhalte, wie beispielsweise die Erreger-Wirt-Interaktionen, zu erforschen, um wichtige Erkenntnisse bezüglich der Überlebens- und Bekämpfungsstrategien beider Organismen zu gewinnen und somit verbesserte diagnostische Methoden oder Therapieansätze entwickeln zu können.

VI SUMMARY

The bacterium *B. persica*, that causes TBRF, is transmitted by the soft tick *O. tholozani* during blood meals. This vector is widely distributed in the Middle East and Central Asia. TBRF poses a considerable health threat to the affected population and also to tourists. The patients suffer from recurrent fever and non-specific symptoms such as chills and headache which may occur. Fever-free intervals are recorded between the fever attacks. The clinical sign “recurrent fever” and a massive presence of spirochetes during a fever period characterize the disease. After diagnosis, an early treatment with antibiotics is recommended and attention should be paid to the potential occurrence of the Jarisch-Herxheimer reaction. In general, not only humans but also animals become ill due to infections with *B. persica*.

Besides in vitro cultivation, in vivo experiments are essential to obtain knowledge about pathogens. To gain new insights into the genesis and the course of the infection, 44 immunocompetent C3H/HeOuJ mice were inoculated intradermally with *B. persica* suspensions at varying concentrations and were observed for a minimum of 30 to a maximum of 50 days. During the complete experiment none of the infected mice showed any clinical signs or abnormal behaviors when compared to control animals, which tested negative in all methods. In this study, 100 % of all animals infected with doses of 1×10^6 , 1×10^4 and 1×10^2 *B. persica* per mouse were positive, whereas the lowest dose of 4×10^0 *B. persica* per mouse was not sufficient to initiate an infection in any of the eight mice. Blood samples were collected according to alternating schedules and screened by real-time PCR targeting the *flaB* gene of *B. persica*. The results revealed one to three peaks of DNA per infected mouse. Furthermore, a delay in the appearance of the first spirochetes in the blood and the peaks of the median concentrations was recorded between the groups when less bacteria were inoculated. Vigorous antibody titers against *B. persica* were detected in all three infected groups after analyzing the mice's sera by a newly developed serological two-tiered test system (ELISA and western blot). At the end of the experiment organs (heart, spleen, urinary bladder, tarsal joint, brain and skin from the injection area) were collected and examined for *B. persica*-specific DNA by PCR as well as cultured for the detection of viable

spirochetes in a home-made liquid medium. The result of tissue investigations clearly identifies the brain and the skin as target organs of *B. persica* infection.

The establishment of an infection model for *B. persica* in immunocompetent mice provides a platform for further ensuing in vivo investigations. It offers the possibility for the pursuit of profound issues, for instance in terms of interactions between the pathogen and the host, to gain advanced insights in the survival and reduction strategies of both organisms which may help to create improved diagnostic methods or therapy approaches.

VII LITERATURVERZEICHNIS

Adeolu M, Gupta RS. A phylogenomic and molecular marker based proposal for the division of the genus *Borrelia* into two genera: the emended genus *Borrelia* containing only the members of the relapsing fever *Borrelia*, and the genus *Borrelia* gen. nov. containing the members of the Lyme disease *Borrelia* (*Borrelia burgdorferi* sensu lato complex). *Antonie van Leeuwenhoek* 2014; 105: 1049–1072.

Adler S, Theodor O, Schieber H. Observations on tick-transmitted human spirochaetosis in Palestine. *Ann Trop Med Parasitol* 1937; 31: 25–35.

Aghighi Z, Assmar M, Piazak N, Javadian E, Seyed Rashti MA, Kia EB, Rassi Y, Vatandoost H. Distribution of soft ticks and their natural infection with *Borrelia* in a focus of relapsing fever in Iran. *Iran J Arthropod Borne Dis* 2007; 1: 14–18.

Alugupalli KR, Michelson AD, Joris I, Schwan TG, Hodivala-Dilke K, Hynes RO, Leong JM. Spirochete-platelet attachment and thrombocytopenia in murine relapsing fever borreliosis. *Blood* 2003; 102: 2843–2850.

Anda P, Sánchez-Yebra W, del Mar Vitutia M, Pérez Pastrana E, Rodríguez I, Miller NS, Backenson PB, Benach JL. A new *Borrelia* species isolated from patients with relapsing fever in Spain. *Lancet* 1996; 348: 162–165.

Arshi S, Majidpoor A, Sadeghi H, Asmar M, Emdadi D, Derakhshan MH. Relapsing fever in Ardabil, a northwestern province of Iran. *Arch Iran Med* 2002; 5: 141–145.

Ashbel R. Observations on some strains of *Spirochaeta persica* in Palestine. *Ann Trop Med Parasitol* 1942; 36: 97–101.

Ashbel R. Notes on *Spirochaeta persica* from Palestine and spirochaetes of relapsing fever from the Western Desert (Tobruk area). Trans R Soc Trop Med Hyg 1949; 42: 409–410.

Assous MV, Wilamowski A, Bercovier H, Marva E. Molecular characterization of tickborne relapsing fever *Borrelia*, Israel. Emerg Infect Dis 2006; 12: 1740–1743.

Assous MV, Wilamowski A. Relapsing fever borreliosis in Eurasia – forgotten, but certainly not gone! Clin Microbiol Infect 2009; 15: 407–414.

Babudieri B. Relapsing fever in Jordan. Bull World Health Organ 1957; 16: 911–928.

Baneth G, Halperin T, Yavzuri M, Klement E, Anug Y, Almagor H, Aizenberg I, Cohensius M, Orr N. Relapsing fever borreliosis in a dog, cat and monkey in Israel - molecular characterization. In: Proc. 28th Annual Israel Veterinary Symposium in memory of Dr. Ora Egozi, 28. April 2004, Israel. Israel J Vet Med 2004; 59: 54.

Baneth G, Nachum-Biala Y, Halperin T, Hershko Y, Kleinerman G, Anug Y, Abdeen Z, Lavy E, Aroch I, Straubinger RK. *Borrelia persica* infection in dogs and cats: clinical manifestations, clinicopathological findings and genetic characterization. Parasit Vectors 2016; 9: 244.

Barbour AG, Tessier SL, Stoenner HG. Variable major proteins of *Borrelia hermsii*. J Exp Med 1982; 156: 1312–1324.

Barbour AG, Burgdorfer W, Hayes SF, Péter O, Aeschlimann A. Isolation of a cultivable spirochete from *Ixodes ricinus* ticks of Switzerland. Curr Microbiol 1983; 8: 123–126.

Barbour AG. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. Yale J Biol Med 1984; 57: 521–525.

Barbour AG, Hayes SF. Biology of *Borrelia* species. Microbiol Rev 1986; 50: 381–400.

Barbour AG. Antigenetic variation of a relapsing fever *Borrelia* species. Annu Rev Microbiol 1990; 44: 155–171.

Barbour AG, Burman N, Carter CJ, Kitten T, Bergström S. Variable antigen genes of the relapsing fever agent *Borrelia hermsii* are activated by promoter addition. Mol Microbiol 1991; 5: 489–493.

Barbour AG, Restrepo BI. Antigenic variation in vector-borne pathogens. Emerg Infect Dis 2000; 6: 449–457.

Barmaki A, Rafinejad J, Vatandoost H, Telmadarraiy Z, Mohtarami F, Leghaei SH, Oshaghi MA. Study on presence of *Borrelia persica* in soft ticks in western Iran. Iran J Arthropod Borne Dis 2010; 4: 19–25.

Barth C, Straubinger RK, Krupka I, Müller E, Sauter-Louis C, Hartmann K. Comparison of different diagnostic assays for the detection of *Borrelia burgdorferi*-specific antibodies in dogs. Vet Clin Pathol 2014; 43: 496–504.

Bayerisches Staatsministerium für Arbeit und Soziales (StMAS). Zahlen & Fakten. In: Asylsozialpolitik. München: StMAS 2016: <http://www.zukunftsministerium.bayern.de/migration/asyl/index.php>, accessed 22.05.2016.

Belperron AA, Dailey CM, Bockenstedt LK. Infection-induced marginal zone B cell production of *Borrelia hermsii*-specific antibody is impaired in the absence of CD1d. J Immunol 2005; 174: 5681–5686.

Benoit VM, Petrich A, Alugupalli KR, Marty-Roix R, Moter A, Leong JM, Boyartchuk VL. Genetic control of the innate immune response to *Borrelia hermsii* influences the course of relapsing fever in inbred strains of mice. *Infect Immun* 2010; 78: 586–594.

Bolz DD, Sundsbak RS, Ma Y, Akira S, Weis JH, Schwan TG, Weis JJ. Dual role of MyD88 in rapid clearance of relapsing fever *Borrelia* spp. *Infect Immun* 2006; 74: 6750–6760.

Bryceson ADM. Clinical pathology of the Jarisch-Herxheimer reaction. *J Infect Dis* 1976; 133: 696–704.

Burkot TR, Wirtz RA, Luft B, Piesman J. An OspA antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay for detecting North American isolates of *Borrelia burgdorferi* in larval and nymphal *Ixodes dammini*. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 272–278.

Cadavid D, Pennington PM, Kerentseva TA, Bergström S, Barbour AG. Immunologic and genetic analyses of VmpA of a neurotropic strain of *Borrelia turicatae*. *Infect Immun* 1997; 65: 3352–3360.

Cadavid D, Barbour AG. Neuroborreliosis during relapsing fever: review of the clinical manifestations, pathology, and treatment of infections in humans and experimental animals. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 151–164.

Cadavid D, Pachner AR, Estanislao L, Patalapati R, Barbour AG. Isogenic serotypes of *Borrelia turicatae* show different localization in the brain and skin of mice. *Infect Immun* 2001; 69: 3389–3397.

Colin de Verdière N, Hamane S, Assous MV, Sertour N, Ferquel E, Cornet M. Tickborne relapsing fever caused by *Borrelia persica*, Uzbekistan and Tajikistan. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 1325–1327.

Connolly SE, Benach JL. Cutting edge: the spirochetemia of murine relapsing fever is cleared by complement-independent bactericidal antibodies. *J Immunol* 2001; 167: 3029–3032.

Cook MJ. Lyme borreliosis: a review of data on transmission time after tick attachment. *Int J Gen Med* 2015; 8: 1–8.

Cutler SJ. Possibilities for relapsing fever reemergence. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 369–374.

Cutler SJ. Relapsing fever – a forgotten disease revealed. *J Appl Microbiol* 2010; 108: 1115–1122.

Deplazes P, Eckert J, von Samson-Himmelstjerna G, Zahner H. Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. 3., überarbeitete Auflage. Stuttgart: Enke Verlag in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co. KG 2013: 372–401.

Dschunkowsky E. Das Rückfallfieber in Persien. *DMW* 1913; 39: 419–420.

Dworkin MS, Anderson DE Jr, Schwan TG, Shoemaker PC, Banerjee SN, Kassen BO, Burgdorfer W. Tick-borne relapsing fever in the northwestern United States and southwestern Canada. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 122–131.

Dworkin MS, Schwan TG, Anderson DE Jr, Borchardt SM. Tick-borne relapsing fever. *Infect Dis Clin North Am* 2008; 22: 449–468.

Elbir H, Larsson P, Normark J, Upreti M, Korenberg E, Larsson C, Bergström S. Genome Sequence of the Asiatic Species *Borrelia persica*. *Genome Announc* 2014; 2: e01127-13.

Euzéby JP. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. Int J Syst Bacteriol 1997a; 47: 590–592. Classification of domains and phyla - Hierarchical classification of prokaryotes (bacteria). In: List of prokaryotic names with standing in nomenclature: <http://www.bacterio.net/-classifphyla.html>, accessed 23.01.2016.

Euzéby JP. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. Int J Syst Bacteriol 1997b; 47: 590–592. Genus *Borrelia*. In: List of prokaryotic names with standing in nomenclature: <http://www.bacterio.net/borrelia.html>, accessed 23.01.2016.

Fekade D, Knox K, Hussein K, Melka A, Lalloo DG, Coxon RE, Warrell DA. Prevention of Jarisch-Herxheimer reactions by treatment with antibodies against tumor necrosis factor α . N Engl J Med 1996; 335: 311–315.

Galun E, Ben-Chetrit E. Possible prevention of tick-borne relapsing fever in patients infected with *Borrelia recurrentis*. J Infect Dis 1984; 150: 617.

Garcia-Monco JC, Miller NS, Backenson PB, Anda P, Benach JL. A mouse model of *Borrelia* meningitis after intradermal injection. J Infect Dis 1997; 175: 1243–1245.

Geigy R, Aeschlimann A. Ratten als Reservoir von *Borrelia duttoni*. Z Tropenmed Parasitol 1957; 8: 96–108.

Goldenberger D, Claas GJ, Bloch-Infanger C, Breidthardt T, Suter B, Martínez M, Neumayr A, Blaich A, Egli A, Osthoff M. Louse-borne relapsing fever (*Borrelia recurrentis*) in an Eritrean refugee arriving in Switzerland, August 2015. Euro Surveill 2015; 20: pii=21204.

Goubau PF. Relapsing Fevers. A Review. Ann Soc Belg Méd Trop 1984; 64: 335–364.

Greene CE, Straubinger RK, Levy SA. Borreliosis. In: Infectious diseases of the dog and cat, 4th edn. Greene CE, ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders 2012: 447–465.

Guerrier G, Doherty T. Comparison of antibiotic regimens for treating louse-borne relapsing fever: a meta-analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2011; 105: 483–490.

Halperin T, Orr N, Cohen R, Hasin T, Davidovitch N, Klement E, Kayouf R, Baneth G, Cohen D, Yavzori M. Detection of relapsing fever in human blood samples from Israel using PCR targeting the glycerophosphodiester phosphodiesterase (GlpQ) gene. *Acta Trop* 2006; 98: 189–195.

Hasin T, Davidovitch N, Cohen R, Dagan T, Romem A, Orr N, Klement E, Lubezky N, Kayouf R, Sela T, Keller N, Derazne E, Halperin T, Yavzori M, Grotto I, Cohen D. Postexposure treatment with doxycycline for the prevention of tick-borne relapsing fever. *N Engl J Med* 2006; 355: 148–155.

Hoch M, Wieser A, Löscher T, Margos G, Pürner F, Zühl J, Seilmaier M, Balzer L, Guggemos W, Rack-Hoch A, von Both U, Hauptvogel K, Schönberger K, Hautmann W, Sing A, Fingerle V. Louse-borne relapsing fever (*Borrelia recurrentis*) diagnosed in 15 refugees from northeast Africa: epidemiology and preventive control measures, Bavaria, Germany, July to October 2015. *Euro Surveill* 2015; 20: pii=30046.

Hovius JWR, de Wever B, Sohne M, Brouwer MC, Coumou J, Wagemakers A, Oei A, Knol H, Narasimhan S, Hodiament CJ, Jahfari S, Pals ST, Horlings HM, Fikrig E, Sprong H, van Oers MHJ. A case of meningoencephalitis by the relapsing fever spirochaete *Borrelia miyamotoi* in Europe. *Lancet* 2013; 382: 658.

Jongejan F, Uilenberg G. The global importance of ticks. *Parasitology* 2004; 129 (Suppl): S3–S14.

Karimi Y, Hovind-Hougen K, Birch-Andersen A, Asmar M. *Borrelia persica* and *B. baltazardi* sp. nov.: experimental pathogenicity for some animals and comparison of the ultrastructure. Ann Microbiol (Paris) 1979; 130B: 157–168.

Kassiri H, Kasiri A, Karimi M, Kasiri E, Lotfi M. The seven-year longitudinal study on relapsing fever borreliosis in western Iran. Asian Pac J Trop Dis 2014a; 4 (Suppl 2): S679–S683.

Kassiri H, Kasiri A, Dostifar K, Lotfi M. The epidemiology of tick-borne relapsing fever in Bijar County, north-western Iran. Journal of Acute Disease 2014b; 3: 224–227.

Kelly R. Cultivation of *Borrelia hermsi*. Science 1971; 173: 443–444.

Krupka I, Knauer J, Lorentzen L, O'Connor TP, Saucier J, Straubinger RK. *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in Europe induce diverse immune responses against C₆ peptides in infected mice. Clin Vaccine Immunol 2009; 16: 1546–1562.

Kutsuna S, Kawabata H, Kasahara K, Takano A, Mikasa K. Case Report: the first case of imported relapsing Fever in Japan. Am J Trop Med Hyg 2013; 89: 460–461.

Larsson C, Andersson M, Pelkonen J, Guo BP, Nordstrand A, Bergström S. Persistent brain infection and disease reactivation in relapsing fever borreliosis. Microbes Infect 2006; 8: 2213–2219.

Larsson C, Bergström S. A novel and simple method for laboratory diagnosis of relapsing fever borreliosis. Open Microbiol J 2008; 2: 10–12.

Larsson C, Lundqvist J, van Rooijen N, Bergström S. A novel animal model of *Borrelia recurrentis* louse-borne relapsing fever borreliosis using immunodeficient mice. PLoS Negl Trop Dis 2009; 3: e522.

Margos G, Wilske B, Sing A, Hizo-Teufel C, Cao W-C, Chu C, Scholz H, Straubinger RK, Fingerle V. *Borrelia bavariensis* sp. nov. is widely distributed in Europe and Asia. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013; 63: 4284–4288.

Marti Ras N, Lascola B, Postic D, Cutler SJ, Rodhain F, Baranton G, Raoult D. Phylogenesis of relapsing fever *Borrelia* spp. *Int J Syst Bacteriol* 1996; 46: 859–865.

Martin F, Oliver AM, Kearney JF. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* 2001; 14: 617–629.

Masoumi Asl H, Goya MM, Vatandoost H, Zahraei SM, Mafi M, Asmar M, Piazak N, Aghighi Z. The epidemiology of tick-borne relapsing fever in Iran during 1997–2006. *Travel Med Infect Dis* 2009; 7: 160–164.

Meier JT, Simon MI, Barbour AG. Antigenic variation is associated with DNA rearrangements in a relapsing fever *Borrelia*. *Cell* 1985; 41: 403–409.

Meislin HW, Bremer JC. Jarisch-Herxheimer reaction. Case report. *JACEP* 1976; 5: 779–781.

Moemenbellah-Fard MD, Benafshi O, Rafinejad J, Ashraf H. Tick-borne relapsing fever in a new highland endemic focus of western Iran. *Ann Trop Med Parasitol* 2009; 103: 529–537.

Naddaf SR, Kishdehi M, Siavashi MR. Comparison of PCR-based diagnosis with centrifuged-based enrichment method for detection of *Borrelia persica* in animal blood samples. *Iran J Arthropod Borne Dis* 2011; 5: 7–12.

Naddaf SR, Ghazinezhad B, Bahramali G, Cutler SJ. Phylogenetic analysis of the spirochete *Borrelia microti*, a potential agent of relapsing fever in Iran. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 2873–2876.

Nordstrand A, Shamaei-Tousi A, Ny A, Bergström S. Delayed invasion of the kidney and brain by *Borrelia crocidurae* in plasminogen-deficient mice. *Infect Immun* 2001; 69: 5832–5839.

Obermeier O. Die Entdeckung von fadenförmigen Gebilden im Blut von Rückfallfieberkranken (1873). Eingeleitet und herausgegeben von Dr. Heinz Zeiss. In: *Klassiker der Medizin*, Band 31. Sudhoff K, ed. Leipzig: Verlag von Johann Ambrosius Barth 1926. unveränderter Nachdruck Leipzig: Zentralantiquariat der DDR 1968: 26–36.

Ogden NH, Artsob H, Margos G, Tsao J. Non-rickettsial tick-borne bacteria and the diseases they cause. In: *Biology of ticks*, Vol 2, 2nd edn. Sonenshine DE, Roe RM, eds. New York: Oxford University Press 2014: 291–296.

Oshaghi MA, Rafinejad J, Choubdar N, Piazak N, Vatandoost H, Telmadarraiy Z, Mohtarami F, Ravasan NM. Discrimination of relapsing fever *Borrelia persica* and *Borrelia microtti* by diagnostic species-specific primers and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011; 11: 201–207.

Parola P, Raoult D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 897–928.

Pennington PM, Allred CD, West CS, Alvarez R, Barbour AG. Arthritis severity and spirochete burden are determined by serotype in the *Borrelia turicatae*-mouse model of Lyme disease. *Infect Immun* 1997; 65: 285–292.

Piesman J, Mather TN, Sinsky RJ, Spielman A. Duration of tick attachment and *Borrelia burgdorferi* transmission. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 557–558.

Piesman J, Schwan TG. Ecology of borreliae and their arthropod vectors. In: *Borrelia: Molecular Biology, Host Interaction and Pathogenesis*. Samuels DS, Radolf JD, eds. Norfolk, UK: Caister Academic Press 2010: 251–278.

Plasterk RHA, Simon MI, Barbour AG. Transposition of structural genes to an expression sequence on a linear plasmid causes antigenic variation in the bacterium *Borrelia hermsii*. *Nature* 1985; 318: 257–263.

Pollack RJ, Telford SR III, Spielman A. Standardization of medium for culturing Lyme disease spirochetes. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1251–1255.

Porcella SF, Raffel SJ, Schrupf ME, Schriefer ME, Dennis DT, Schwan TG. Serodiagnosis of louse-borne relapsing fever with glycerophosphodiester phosphodiesterase (GlpQ) from *Borrelia recurrentis*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3561–3571.

Pound MW, May DB. Proposed mechanisms and preventative options of Jarisch-Herxheimer reactions. *J Clin Pharm Ther* 2005; 30: 291–295.

Preac-Mursic V, Wilske B, Schierz G. European *Borrelia burgdorferi* isolated from humans and ticks culture conditions and antibiotic susceptibility. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg A* 1986; 263: 112–118.

Rafinejad J, Choubdar N, Oshaghi MA, Piazak N, Satvat T, Mohtarami F, Barmaki A. Detection of *Borrelia persica* infection in *Ornithodoros tholozani* using PCR targeting *rrs* gene and xenodiagnosis. *Iran J Public Health* 2011; 40: 138–145.

Rafinejad J, Shemshad K, Banafshi O. Epidemiological study on tick-borne (Acari: Argasidae) relapsing fever in Kurdistan Province, Iran, 2000–2004. *Fla Entomol* 2012; 95: 758–763.

Rafyi A. *Spirochaeta microti* n. sp., parasite du campagnol (*Microtus* sp.) en Iran. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 1947; 40: 149–151.

Rebaudet S, Parola P. Epidemiology of relapsing fever borreliosis in Europe. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006; 48: 11–15.

Restrepo BI, Carter CJ, Barbour AG. Activation of a *vmp* pseudogene in *Borrelia hermsii*: an alternate mechanism of antigenic variation during relapsing fever. *Mol Microbiol* 1994a; 13: 287–299.

Restrepo BI, Barbour AG. Antigen diversity in the bacterium *B. hermsii* through "somatic" mutations in rearranged *vmp* genes. *Cell* 1994b; 78: 867–876.

Richter D, Schlee DB, Matuschka F-R. Relapsing fever-like spirochetes infecting European vector tick of Lyme disease agent. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 697–701.

Richter D, Debski A, Hubalek Z, Matuschka F-R. Absence of Lyme disease spirochetes in larval *Ixodes ricinus* ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2012; 12: 21–27.

Richter D, Schröder B, Hartmann NK, Matuschka F-R. Spatial stratification of various Lyme disease spirochetes in a Central European site. *FEMS Microbiol Ecol* 2013; 83: 738–744.

Rodhain F. *Borrelia* et fièvre récurrentes: aspects épidémiologique actuels. *Bull Inst Pasteur* 1976; 74: 173–218.

Roscoe C, Epperly T. Tick-borne relapsing fever. *Am Fam Physician* 2005; 72: 2039–2044.

Rostami A, Zaeemi M, Piazhak N, Mazaheri Nezhad Fard R. A case report of atypical borreliosis in a dog. *IJVST* 2011; 3: 49–56.

Safdie G, Farrah IY, Yahia R, Marva E, Wilamowski A, Sawalha SS, Wald N, Schmiedel J, Moter A, Göbel UB, Bercovier H, Abdeen Z, Assous MV, Fishman Y. Molecular characterization of *Borrelia persica*, the agent of tick borne relapsing fever in Israel and the Palestinian Authority. *PLoS ONE* 2010; 5: e14105.

Sarih M, Garnier M, Boudebouch N, Bouattour A, Rihani A, Hassar M, Gern L, Postic D, Cornet M. *Borrelia hispanica* relapsing fever, Morocco. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 1626–1629.

Schuhardt VT, Wilkerson M. Relapse phenomena in rats infected with single spirochetes (*Borrelia recurrentis* var. *turicatae*). *J Bacteriol* 1951; 62: 215–219.

Schwan TG, Schrumpf ME, Hinnebusch BJ, Anderson DE Jr., Konkel ME. GlpQ: an antigen for serological discrimination between relapsing fever and Lyme borreliosis. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2483–2492.

Schwan TG, Piesman J. Vector interactions and molecular adaptations of lyme disease and relapsing fever spirochetes associated with transmission by ticks. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 115–121.

Schwarzer S, Margos G, Overzier E, Fingerle V, Baneth G, Straubinger RK. *Borrelia persica*: *In vitro* cultivation and characterization via conventional PCR and multilocus sequence analysis of two strains isolated from a cat and ticks from Israel. *Ticks Tick Borne Dis* 2015; 6: 751–757.

Sewify GH, Habib SM. Biological control of the tick fowl *Argas persicargas persicus* by the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *J Pest Sci* 2001; 74: 121–123.

Shang ES, Skare JT, Exner MM, Blanco DR, Kagan BL, Miller JN, Lovett MA. Isolation and characterization of the outer membrane of *Borrelia hermsii*. *Infect Immun* 1998; 66: 1082–1091.

Shin SJ, Chang Y-F, Jacobson RH, Shaw E, Lauderdale T-L, Appel MJ, Lein DH. Cross-reactivity between *B. burgdorferi* and other spirochetes affects specificity of serotests for detection of antibodies to the Lyme disease agent in dogs. *Vet Microbiol* 1993; 36: 161–174.

Shirani D, Rakhshanpoor A, Cutler SJ, Ghazinezhad B, Naddaf SR. A case of canine borreliosis in Iran caused by *Borrelia persica*. Ticks Tick Borne Dis 2016; 7: 424–426.

Sidi G, Davidovitch N, Balicer RD, Anis E, Grotto I, Schwartz E. Tickborne relapsing fever in Israel. Emerg Infect Dis 2005; 11: 1784–1786.

Sinsky RJ, Piesman J. Ear punch biopsy method for detection and isolation of *Borrelia burgdorferi* from rodents. J Clin Microbiol 1989; 27: 1723–1727.

Southern PM Jr., Sanford JP. Relapsing fever: a clinical and microbiological review. Medicine 1969; 48: 129–149.

Stoenner HG. Biology of *Borrelia hermsii* in Kelly medium. J Appl Microbiol 1974; 28: 540–543.

Stoenner HG, Dodd T, Larsen C. Antigenic variation of *Borrelia hermsii*. J Exp Med 1982; 156: 1297–1311.

Tholozan JD. Des phénomènes morbides produits par la piquûre de parasites voisins des ixodes ou tiques les Argas de Perse. Mém Soc Biol 1882; 34: 15–22.

Töpfer KH, Straubinger RK. Characterization of the humoral immune response in dogs after vaccination against the Lyme borreliosis agent A study with five commercial vaccines using two different vaccination schedules. Vaccine 2007; 25: 314–326.

Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JAM. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. Nucleic Acids Res 2007; 35: W71–74.

van Dam AP, van Gool T, Wetsteyn JCFM, Dankert J. Tick-borne relapsing fever imported from West Africa: diagnosis by quantitative buffy coat analysis and in vitro culture of *Borrelia crocidurae*. J Clin Microbiol 1999; 37: 2027–2030.

Vatandoost H, Ghaderi A, Javadian E, Zahir Nia AH, Rassi Y, Piazak N, Kia EB, Shaeghi M, Telmodarreiy Z, Abolhasani M. Distribution of soft ticks and their infection with *Borrelia* in Hamadan Province, Iran. Iran J Public Health 2003; 32: 22–24.

Vaughan C, Cronin CC, Walsh EK, Whelton M. The Jarisch-Herxheimer reaction in leptospirosis. Postgrad Med J 1994; 70: 118–121.

Vuyyuru R, Liu H, Manser T, Alugupalli KR. Characteristics of *Borrelia hermsii* infection in human hematopoietic stem cell-engrafted mice mirror those of human relapsing fever. PNAS 2011; 108: 20707–20712.

Wang G, Ojaimi C, Iyer R, Saksenberg V, McClain SA, Wormser GP, Schwartz I. Impact of genotypic variation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto on kinetics of dissemination and severity of disease in C3H/HeJ mice. Infect Immun 2001; 69: 4303–4312.

Wang G, Ojaimi C, Wu H, Saksenberg V, Iyer R, Liveris D, McClain SA, Wormser GP, Schwartz I. Disease severity in a murine model of lyme borreliosis is associated with the genotype of the infecting *Borrelia burgdorferi* sensu stricto strain. J Infect Dis 2002; 186: 782–791.

Wang G, Schwartz I. Genus II. *Borrelia* Schwellengrebel 1907, 582^{AL}. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 4, 2nd edn. Krieg NR, Staley JT, Brown DR, Hedlund BP, Paster BJ, Ward NL, Ludwig W, Whitman WB, Parte AC, eds. New York: Springer 2010: 484–498.

Warrell DA, Perine PL, Krause DW, Bing DH, MacDougal SJ. Pathophysiology and immunology of the Jarisch-Herxheimer-like reaction in louse-borne relapsing fever: comparison of tetracycline and slow-release penicillin. *J Infect Dis* 1983; 147: 898–909.

Wilamowski A, Assous M, Anis E, Marva E. Tick-borne relapsing fever (RF) in the civilian population of Israel, 1980-2002. In: *Proc. Fifth International Conference on Urban Pests*, 10.–13. July 2005, Singapore. Lee C-Y, Robinson WH, eds. Malaysia: Perniagaan Ph'ng @ P&Y Design Network 2005: 399–407.

Wilting KR, Stienstra Y, Sinha B, Braks M, Cornish D, Grundmann H. Louse-borne relapsing fever (*Borrelia recurrentis*) in asylum seekers from Eritrea, the Netherlands, July 2015. *Euro Surveill* 2015; 20: pii=21196.

Wojciechowska-Koszko I, Mączyńska I, Szych Z, Giedrys-Kalemba S. Serodiagnosis of borreliosis: indirect immunofluorescence assay, enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2011; 59: 69–77.

Yokota M, Morshed MG, Nakazawa T, Konishi H. Protective activity of *Borrelia duttonii*-specific immunoglobulin subclasses in mice. *J Med Microbiol* 1997; 46: 675–680.

Yossepowitch O, Gottesman T, Schwartz-Harari O, Soroksky A, Dan M. Aseptic meningitis and adult respiratory distress syndrome caused by *Borrelia persica*. *Infection* 2012; 40: 695–697.

Zamani Z, Arjmand M, Oreiz F, Soleimani M, Hosseini SH, Assmar M, Javadian S, Saghiri R, Pourfallah F. Culture of *Borrelia persica* and its flagellar antigen *in vitro*. *Pak J Biol Sci* 2014; 17: 190–197.

VIII ANHANG

Tabelle A1: Rezeptur der phosphatgepufferten Kochsalzlösung

Zutaten	Menge*
destilliertes Wasser	1 l
Natriumchlorid	80 g
Dinatriumhydrogenphosphat-Heptahydrat	11,5 g
Kaliumchlorid	2 g
Kaliumdihydrogenphosphat	2 g

*für eine 10-fach konzentrierte Stammlösung

Herstellung einer Stammlösung (10-fach konzentriert):

- Salze in destilliertem Wasser gemäß Rezeptur lösen
- pH-Wertkontrolle: ca. 6,8

Herstellung einer Gebrauchslösung (einfach konzentriert):

- 100 ml Stammlösung mit 900 ml sterilem destillierten Wasser verdünnen
- pH-Wertkontrolle: ca. 7,3
- 15 min bei 121 °C autoklavieren

bitte entsprechendes Feld ankreuzen und am Ende die Punkte zusammenrechnen

Datum:	Untersucher:	Käfignummer:	Maus:	Gewicht in g:				
Allgemeinzustand:			Verhalten:		klinische Untersuchung:			
0 Punkte	je 1 Punkt	je 3 Punkte	0 Punkte	je 1 Punkt	je 3 Punkte	0 Punkte	je 1 Punkt	je 3 Punkte
glänzendes, glattes Fell	leicht stumpfes Fell, Feldefekte	gesträubtes Fell, verklebt und ungepflegt	neugierig	hyperaktiv, nervös	apathisch	ungestört	verstärkte Atmung	Atemnot, Bauchatmung
Physiologische Körperhaltung und Bewegung	Hockstellung und /oder erhöhter Muskeltonus, Verminderter Bewegungsdrang	Bauchlage, hoher oder fehlender Muskeltonus	aufmerksam	ängstlich, in Häuschen versteckt	komatös		leichtes Hämatom ein bis zwei Tage nach der Blutentnahme	starkes Hämatom, Schmerzhaftigkeit im Bereich der V. facialis (Blutentnahme)
klare, saubere Augen und Körperöffnungen	Augen mäßig verklebt, Nasenausfluss	verklebte, geschlossene Augen, starker Nasenausfluss	interessiert	reduziert, verlangsamte Reaktion auf Reiz von außen	zittern		Durchfall	schwere Verletzungen
guter Ernährungszustand, Körpergewicht unbeeinflusst oder Anstieg	reduzierter Ernährungszustand bei Palpation, Körpergewicht Änderung < 5 %	stark reduzierter Ernährungszustand and bei Palpation, Gewichtsreduktion > 5 %	Reaktion auf Reiz von außen		taumeln		Lahmheit an einem oder mehreren Gelenken	veränderte Schleimhäute (Ikterus, blasse Schleimhäute oder intensiv gerötet)
			normales Sozialverhalten		isoliert von der Gruppe			starke Umfangsvermehrung im Bereich der Injektionsstelle, druckempfindlich, warm
Summe:								
Summe total: _____								
Bewertung:	bei Punktesumme:	Maßnahmen:						
Belastungsgrad 0	0	keine						
Belastungsgrad 1	1	spezifische Beobachtung						
Belastungsgrad 2	3	Versuchsabbruch						
Belastungsgrad 3	6	Versuchsabbruch						

Abbildung A1: Score-Sheet

IX DANKSAGUNG

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, meinem Doktorvater, der mir dieses interessante und vielschichtige Thema zur Verfügung gestellt hat. Seine fachliche Begeisterung förderte dabei sowohl den Ausbau als auch die Umsetzung der Doktorarbeit. Des Weiteren konnte ich mir seiner hervorragenden Betreuung und tatkräftigen Unterstützung zu jeder Zeit sicher sein.

Frau Dr. Evelyn Overzier und Frau Dr. Anna Rettinger gilt mein besonderer Dank. Beide standen mir immer mit Rat und Tat zur Seite. Neben anregenden fachlichen Diskussionen war auch stets Zeit für ein aufmunterndes Wort. Herrn Dr. Georg Wolf sowie Herrn Dr. Robert Fux möchte ich an dieser Stelle ebenso für ihre Hilfsbereitschaft und guten Hinweise danken. Von großer Bedeutung in meiner Anfangszeit waren Herr Dr. Viktor Dyachenko und Frau Dr. Inke Krupka-Dyachenko, die mich in den Laboralltag einführten und der forschenden Denkweise näher brachten.

Für herausragende technische Assistenz danke ich Frau Elisabeth Aschinger-Kirch, Stephanie Hiereth und Anke Schiller. Ihre zuvorkommende Art und methodische Sicherheit verhalfen mir zu einer schnellen und fundierten Einarbeitung.

Frau Liucun Liang möchte ich neben den Doktoranden Shari Fell, Jinyong Wang, Marjolaine Godin, Anja Spadinger und Annegret Wiedemann, welche immer ein offenes Ohr für mich hatten, herzlich danken. Sie begleitete mich stets ohne Zögern sogar an den Wochenenden in den Mausstall.

Ich werde die fantastische Atmosphäre unter den Kollegen sehr vermissen. Die Pausengespräche mit Kuchen und Schokolade sowie unsere Ausflüge waren mir eine willkommene Abwechslung.

Unendlicher Dank gilt meiner gesamten Familie, welche mich nicht nur finanziell, sondern auch mental während meines Studiums und der Promotion unterstützte. Sie hat mich zu dem gemacht, was ich heute bin.

Zuletzt möchte ich meinem Freund Tobias sehr danken, der die Zeit des Zusammenschreibens so meisterlich über sich ergehen lassen hat und immer Verständnis für mich aufbringen konnte. Seine Liebe und Fürsorglichkeit gaben mir Rückhalt, um meine Promotion abschließen zu können.